

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación *in vitro* de la capacidad de extractos orgánicos de
biodiversidad ecuatoriana para inhibir al patógeno *Mycosphaerella
fijiensis* (Morelet) causante de la Sigatoka Negra en banano.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas**

MARIA LORENA PAZMIÑO HORRA

Quito, 2014

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata María Lorena Pazmiño Horra ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, pude ser presentada para la calificación correspondiente

M.Sc. Alexandra Narváez T.

DIRECTORA DE LA DISERTACIÓN

DEDICATORIA

A mi familia y mis GSDs con mucho amor y cariño,

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Madre, por siempre brindarme su apoyo, sacrificio, amor y por acompañarme durante toda esta etapa.

A mi Padre, por siempre darme fuerzas e impulso durante toda la carrera. A mis hermanos Cristina, Jaime y Diana por ser mis mejores amigos que me han alentado en cada momento.

A mis GSDs, que son una parte muy importante para seguir avanzando en cada momento y me llenan de alegría y paz.

Un sincero agradecimiento dirigido al Ingeniero Gustavo Marún, que fue el que inició con la idea de investigar más al banano, y familia por su guía en la fase de campo brindándome información relevante.

Al Ingeniero Nelson Martínez, por su tiempo y facilidades brindadas .

A la Dra Esther Peralta, CIBE-ESPOL, por su donación tan valiosa de la cepa en estudio.

A Alexandra Narváez M.Sc. por la oportunidad brindada de realizar este trabajo y apoyo durante todo este largo proceso. A Mtr. Mercedes Rodríguez por sus sugerencias y preocupación. A la Dra. Iliana Alcocer por sus comentarios y tiempo brindado revisando el presente trabajo, siendo una gran ayuda.

A Stephany Villota por su guía, observaciones, colaboración y ayuda durante la fase de laboratorio.

A los chicos de Ecuaperforación, Lili, Rocío, Johan y Luís por su tiempo dedicado y ayuda desinteresada.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 EL BANANO Y SU PRODUCCIÓN NACIONAL.....	3
3.2 ENFERMEDADES Y AGENTES PATÓGENOS.....	6
3.4 ORGANISMOS ENDÓFITOS	14
3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES BIOCONTROLADORES	16
3.6. JUSTIFICACIÓN	17
3.7. OBJETIVOS	17
3.7.1. OBJETIVO GENERAL	17
3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 SITIOS DE COLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD	19
4.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	20
4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	20
4.3.1 CLASIFICACIÓN EN MORFOTIPOS	20
4.4 <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (MORELET).....	22
4.5 ENSAYOS CON EXTRACTOS ENDOFÍTICOS Y BOTÁNICOS	23
4.6 ENSAYOS ANTAGONISMO	25
4.6.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTAGONISMO	25
5. RESULTADOS	27
5.1 SITIOS DE COLECCIÓN	27
5.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	27
5.2.1 CLASIFICACIÓN EN MORFOTIPOS	28
5.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	28
5.3. ENSAYOS CON EXTRACTOS ENDÓFITICOS Y BOTÁNICOS	29
5.3.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	31

5.4.	ENSAYOS DE ANTAGONISMO	31
5.4.1.	EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTAGONISMO	33
6.	DISCUSIÓN	34
7.	CONCLUSIONES	41
8.	LITERATURA CITADA	42
9.	FIGURAS	54
10.	TABLAS	64
11	ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de participación porcentual de la producción de banano en Ecuador	55
Figura 2. Imágenes del progreso de la enfermedad Sigatoka Negra sobre una lámina de banano.....	56
Figura 3. Sitios de colección, áreas en hectáreas de las provincias de Los Ríos y El Oro.	57
Figura 4. Porcentaje de hongos aislados en Los Ríos y El Oro	58
Figura 5. Porcentaje de hongos aislados por localidad.....	59
Figura 6. Fotografías de la agrupación de ciertos morfotipos según sus características morfológicas presentadas	60
Figura 7. Fotografías de distintos morfotipos obtenidos de la filosfera del banano.....	61
Figura 8. Progreso de crecimiento del inoculo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	62
Figura 9. Fotografías de la prueba de antagonismo	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Códigos asignados a las tomas de muestras de hojas de banano colectadas en las distintas localidades de las provincias Los Ríos y El Oro	65
Tabla 2. Lista de los morfotipos con mayor incidencia con su respectiva identificación y localidad proveniente.....	66
Tabla 3. Análisis molecular de secuencias mediante la herramienta BLAST.....	67
Tabla 4. Identificación molecular de los morfotipos fúngicos utilizando la sub unidad 5.8S rRNA (ITS 2 e ITS4).	68
Tabla 5. Descripción de las 20 diferentes especies patógenas aisladas de la filosfera de las hojas de banano, y los cultivos a los que afectan	69
Tabla 6. Códigos e identificación de los extractos botánicos utilizados.	70
Tabla 7. Códigos e identificación de los extractos fúngicos utilizados, suspendidos en metanol.	71
Tabla 8 Porcentajes de áreas que muestran inhibición de crecimiento de <i>M. fjiensis</i>	72
Tabla 9. Crecimiento de la colonia de <i>M. fjiensis</i> durante la prueba de antagonismo	75
Tabla 10. Efecto del organismo endofito, <i>Epicoccum nigrum</i>	76

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Métodos de aislamiento de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a partir de hojas infestadas.	78
Anexo 2. Secuencias de los primers utilizados ITS1, e ITS 4.....	81
Anexo 3. Ensayos con extractos para <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	81
Anexo 4. Prueba de homogeneidad de varianzas de los valores de las fracciones botánicas sin afectación de crecimiento de <i>M. fijiensis</i> a los 7 días. Los valores de las áreas se las estimó con el programa ImageJv.	83
Anexo 5. ANOVA de los valores de las áreas de cada cuadrante para cada extracto	83
Anexo 6. Prueba de homogeneidad de varianzas para las fracciones botánicas a los 14 días.....	84
Anexo 7. ANOVA	84
Anexo 8. Pruebas de homogeneidad de varianzas a los 21 días.....	84
Anexo 9. ANOVA	85
Anexo 10. Pruebas de homogeneidad de varianza para las áreas de las fracciones fúngicas a los 7 días	85
Anexo 11. ANOVA para los datos de las fracciones fúngicas a los 7 días	85
Anexo 12. Pruebas de homogeneidad de varianzas para las áreas de las fracciones fúngicas a los 14 días	86
Anexo 13. ANOVA a los 14 días fracciones fúngicas	86
Anexo 14. Pruebas de homogeneidad de varianzas para las fracciones fúngicas, 21 días del ensayo	86
Anexo 15. Pruebas fúngicas a los 21 días	87
Anexo 16. ANOVA encajado a los 21 días para las fracciones botánicas y fúngicas.....	87

1. RESUMEN

El Ecuador es considerado el mayor exportador de banano a nivel mundial. Anualmente, exporta más de 5 millones de toneladas de banano. Las provincias más importantes que intervienen en la producción de banano son: Los Ríos, El Oro y Guayas. En la última década la Sigatoka negra se ha posicionado como una de las enfermedades con mayor impacto económico para el sector bananero. La Sigatoka negra es una enfermedad que afecta al follaje de las plantas de banano y es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. El uso extensivo de fungicidas ha causado resistencia en este fitopatógeno. Actualmente, han surgido varias estrategias innovadoras con el fin de reducir el control químico convencional reemplazándolo con el uso de agentes biocontroladores. El objetivo de esta investigación fue conocer el potencial de inhibición de 30 extractos botánicos y 28 extractos de hongos endófitos para el control de *M. fijiensis* in vitro. Los dos tipos de extractos, tanto botánicos como endófitos obtenidos con base en diclorometano, acetona y metanol, presentaron inhibición del crecimiento del patógeno. De los extractos fúngicos, 14 mostraron actividad inhibitoria de crecimiento y solamente 11 extractos botánicos demostraron una actividad antifúngica contra *M. fijiensis*. Además, el presente trabajo evaluó la capacidad antagonista entre *Epicoccum nigrum* y el fitopatógeno, donde se evidenció que no hubo antagonismo en el crecimiento de *M. fijiensis*. Adicionalmente se aislaron los microorganismos asociados a la filosfera del banano, obteniendo alrededor del 95% correspondiente a hongos patógenos. Los extractos de biocontrol demostraron distintos efectos antifúngicos siendo unos más efectivos que otros.

Palabras Claves: actividad antifúngica, antagonismo, banana, biocontrol, endófitos, fitopatógenos, *Mycosphaerella fijiensis*. Sigatoka negra.

2. ABSTRACT

Ecuador is the world's largest exporter of bananas. It exports over 5 million tons of bananas annually. Most of the production comes from three provinces: Los Rios, El Oro and Guayas. In the last decade, black Sigatoka has been pinpointed as one of the diseases with the greatest economic impact on the banana producing countries. Black Sigatoka is caused by the phytopathogen *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, which develops an association with the banana plant leaf. The treatment demands increasing amounts of fungicide applications, which has resulted in a resistance created by the organism that causes the disease. There are several innovative strategies aiming to reduce the conventional chemical control treatments by replacing them with bio-control agents. The aim of this study was to evaluate the inhibition potential of 30 botanical extracts and 28 endophytic fungi extracts on *M. fijiensis* in vitro. Both, the botanic and endophytic extracts based on dichloromethane, acetone and methanol, presented growth inhibition of the pathogen. Only 14 of the endophytic fungi extracts inhibited growth activity and 11 of the botanical extracts showed anti fungal activity against *M. fijiensis*. Furthermore, this research evaluated the antagonistic effect between *Epicoccum nigrum* and the phytopathogen of interest where no antagonist effect was detected. Additionally, microorganisms associated to the banana phyllosphere were isolated obtaining close to 95% of pathogenic organisms. The bio-control extracts had different antifungal effects proving some to be more effective than others.

Keywords: antagonism, antifungal activity, banana, bio-control, Black Sigatoka, endophytes, *Mycosphaerella fijiensis*, phytopathogens.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 EL BANANO Y SU PRODUCCIÓN NACIONAL

El banano es una monocotiledónea del género *Musa*, familia Musaceae, encontrada a lo largo de la mayoría de las regiones tropicales y de temperatura cálida, especialmente aquellas con altas precipitaciones. Se considera que el sureste de Asia es su lugar de origen y desde este punto fue extendiéndose a distintos continentes como consecuencia de la migración del hombre (Nuangmek *et al.*, 2008, Barcos *et al.*, 2009). Ernest Cheesman (1947) clasificó al género *Musa* en cuatro secciones: *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa* y *Australimusa*, basándose en el número de cromosomas y sus características morfológicas. Las especies con 11 pares de cromosomas se las puso dentro de las secciones *Eumusa* y *Rhodochlamys*. Mientras que las especies con 10 pares de cromosomas se las agrupó en las secciones *Callimusa* y *Australimusa*. En la sección *Eumusa* se distinguen los cultivares triploides resultados del cruce entre *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB) que dan principio a las musáceas comestibles más importantes:

AAA: Bananos como Gros Michel y Cavendish (como Filipino, Gigante, Gran Enano, Valery y Williams).

AAB: Plátanos como Curraré y Dominico.

ABB: Guineos como Cuadrado y Pelipita.

En el 2013, el botánico Hakkinen hizo una revisión del género *Musa* y lo redujo a dos secciones en donde la sección *Rhodochlamys* está dentro de la sección *Eumusa*, renombrándola *Musa*. La segunda sección es *Callimusa*, que contiene a la sección *Australimusa* (Häkkinen,2013).

Todos los taxónomos que han estudiado el banano, coinciden en que no puede asignarse un único nombre científico a todas las bananas comestibles. El nombre *Musa acuminata* podría aplicarse a los tipos diploides (AA), sin semillas y a los triploides (AAA) de bananas de postre, tales como Pisang Mas y Gran Enano y, de forma similar, *Musa balbisiana* podría utilizarse para los tipos diploides puros (BB) y triploides (BBB). Según la información del INEC (2009), en Ecuador el banano es cultivado entre 0 a 300 metros sobre el nivel del mar. Necesita de 100 mm a 180 mm de agua durante todos los meses del año y la temperatura promedio para su desarrollo es de 25 °C.

Anualmente, en el mundo se produce un promedio de 78,8 millones de toneladas de banano de las cuales 16,3 millones de toneladas se exportan y las restantes se dedican al autoconsumo. Los principales países vendedores de la fruta a nivel mundial son: Ecuador, Filipinas, Costa Rica, Colombia y Guatemala; mientras que los principales importadores son: Estados Unidos, Alemania, Bélgica y Japón. Tres de cada diez bananos consumidos a nivel mundial son producidos en el Ecuador (Asociación de Bananeros del Ecuador, 2009).

Actualmente en el 2014, el banano es el segundo rubro tradicional de exportación de Ecuador después del petróleo. La fruta generó el récord de \$2 373 millones en 2013 frente a \$2 078 millones de 2012, según el Banco Central ecuatoriano.

Ecuador ha llegado a ser uno de los mayores productores de banano y el primer exportador de este cultivo en el mundo. Dentro del Ecuador, las provincias que agrupan el 91% de los productores del país son El Oro, Guayas y Los Ríos (Campuzano *et al.*, 2010). En la Figura 1, se muestra la distribución y densidad del cultivo de banano en el Ecuador.

La industria bananera tiene una importancia relevante para el producto interno bruto (PIB), ya que en promedio representa un 26% del PIB agrícola del país y aporta en un 2% al PIB total, siendo uno de los productos tradicionales dentro de las exportaciones ecuatorianas. Generando así fuentes de trabajo e ingresos a 2 millones de personas involucradas en las diferentes etapas de su cadena de valor (Banco Central del Ecuador, 2009).

En nuestro país, el cultivo del banano está distribuido en todo el litoral ecuatoriano. En especial se cultiva las variedades conocidas como: GROS MICHEL Y CAVENDISH (Guía bananera, 2012).

Ecuador al ser el mayor exportador de la Comunidad Andina de Naciones, también es el país que concentra la mayor cantidad de superficie cosechada en la región con cerca del 79,84 % del total. Le siguen Colombia con un 21,78%, Bolivia con un 6,99%, Perú por su parte no dedica ninguna superficie agrícola al cultivo de este producto (INEC, 2012).

Por lo general la actividad bananera mundial está sujeta a dos temporadas conocidas como: alta y baja. En la primera, se habla de los tres primeros meses del año (a veces cuatro) donde las condiciones climáticas, viales, de transporte, etc. son mejores para la producción a nivel interno; y a nivel externo la demanda también es generalmente más elevada. Por otro lado, en la segunda temporada se presencia un pico de producción en los países centroamericanos, razón por la cual el precio es más bajo en los mercados internacionales y la producción nacional se debe vender a precios más bajos (Marín *et al.*, 2003).

De acuerdo al tipo de manejo que se le da al cultivo de banano, existe una producción convencional y una orgánica. La producción agrícola convencional o tradicional se

caracteriza por el uso parcial o total de insumos sintéticos o químicos, con el fin de incrementar la producción mediante fertilizantes, y de proteger de plagas con el uso de plaguicidas. Por otra parte también está la producción orgánica donde no se utilizan insumos sintéticos y sus métodos promueven la fertilidad del suelo y refuerza procesos biológicos y ecológicos sin el uso de plaguicidas (Marín *et al.*, 2003).

Asimismo cuenta con una oferta de banano orgánico certificado, disponible todo el año, en donde se utiliza fertirriego con Bioles, que son biofertilizantes orgánicos que datan desde la época incaica, fertilización orgánica con productos naturales propios del país y un manejo controlado de plagas, mediante biodiversidad biológica. En este aspecto, Campuzano y colaboradores (2010) determinaron la diferencia que existe entre la producción convencional y orgánica, considerando varios cambios físico - químicos que experimenta el banano Cavendish durante esta etapa. Ésta investigación concluye demostrando que no existe una diferencia significativa entre los dos tipos de producción, sin embargo se pudo demostrar que el banano orgánico tenía una mayor vida útil, es decir un mayor lapso de tiempo en percha antes de su descomposición.

3.2 ENFERMEDADES Y AGENTES PATÓGENOS

En el Ecuador el cultivo del banano es atacado por varios patógenos que causan una gran variedad de enfermedades como las virosis, enfermedades sistémicas bacterianas como el moko, erwinia o cogollo negro; enfermedades fúngicas como la Sigatoka negra, Sigatoka amarilla, mal de Panamá y las causadas por distintas plagas como caterpillar, vaquita, cochinilla, picudo negro, entre otros (Orozco-Santos *et al.*, 2011).

De todas estas la de mayor importancia es la "Sigatoka negra", que es producida por el hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Es considerada mundialmente como una de las enfermedades más arrasadoras en el campo bananero. Ante la ausencia de medidas de control o manejo de este hongo, la enfermedad puede reducir hasta en un 50% el peso del racimo y causar pérdidas del 100% de la producción debido al deterioro en la calidad del fruto tanto en longitud como grosor. Además, en condiciones de un control deficiente, puede inducir a la maduración prematura de los frutos, ya sea en el campo o durante su transporte a los mercados de destino, lo que representa uno de los principales riesgos en las plantaciones comerciales (Stover 1980, Marín y Romero 1992, Marín *et al.*, 2003, Romero y Guzmán 2006, Rodríguez-Gaviria y Cayón 2008).

El combate de la Sigatoka negra constituye uno de los principales rubros para la industria bananera, ya que puede alcanzar hasta un 27% del costo total de la producción (Marín *et al.*, 2008).

Los patógenos pueden inmediatamente desafiar al sistema de protección de las plantas, sobre todo si en éstas se encuentran heridas, debido a que las defensas físicas de la planta se han eliminado. Las hojas al ser tejido delicado y el preferido por distintos herbívoros, son las más vulnerables en presentar heridas, las cuales se convierten en una puerta de entrada para distintos patógenos del ambiente (Carlton *et al.*, 1992).

Los patógenos microbianos de plantas son conocidos por presentar varias formas de cepas, biotipos y variedades, lo que les hace diferir en: su potencial patogénico, sensibilidad a químicos, y condiciones ambientales (Narayanasamy, 2013). De las 100.000 especies descritas de hongos, el 2% son patógenos de plantas (MycoBank, 2014).

Existe una diversidad de microorganismos asociados al banano, tanto patógenos como no patógenos. En el 2001, Photita y colaboradores aislaron sesenta y un diferentes endófitos de plantas asintomáticas de *Musa* sp. De estos, *Cladosporium musae*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Cordana musae* y *Pestalotiopsis* spp. Habían sido previamente reportados como patógenos del banano. Asimismo, otros géneros que incluyen varias especies que pueden ser patógenos comunes y que fueron aislados como endófitos son: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Nigrospora*, *Phoma* y *Verticillium*.

La Sigatoka amarilla, fue descubierta en la isla de Java en el año de 1902, luego fue reportada en la isla de Fiji en 1912, cincuenta y un años más tarde (1963) la Sigatoka negra fue descubierta en la misma isla a unos 60 Km del valle de Sigatoka, donde fue reportada por primera vez. Sin embargo, hubo evidencia de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico muchos años antes. En Centro América se descubrió por primera vez en Honduras en 1972, donde en una zona específica coexistió con la Sigatoka amarilla, la cual fue desplazada de una manera inesperada por la Sigatoka negra debido a la capacidad de propagación de sus esporas e irrumpió severamente en las plantaciones de ese país. En Sudamérica, La Sigatoka negra se registró en 1981 en Colombia, en 1986 en Ecuador y luego se propagó por el resto de la región (Marín y Romero, 1992).

La enfermedad se ha dispersado por todo el continente americano y el Caribe. En los diferentes países han ocurrido severas epidemias, que han obligado a intensificar las medidas de combate y han puesto de manifiesto la necesidad de estrategias de manejo integrado de la enfermedad, para mitigar su impacto negativo (Guzmán, 2006). El desarrollo de la Sigatoka negra depende de las condiciones del clima, como lluvia, humedad y temperatura. Su ingreso al tejido foliar es a través de los estomas de las plantas,

donde introduce su tubo germinativo logrando reproducirse en la cavidad sub estomática, repoblando nuevos estomas. Seguidamente la enfermedad culmina produciendo una necrosis en las hojas de la planta lo que les impide realizar la fotosíntesis de una manera óptima, y por consiguiente la planta reduce su crecimiento y la producción de frutos, y en algunos casos llega a su muerte afectando su productividad en las distintas plantaciones (Tumbaco y Jiménez, 2011).

3.3. CARÁCTERÍSTICAS DE LA SIGATOKA NEGRA Y SU CONTROL

La Sigatoka negra induce daños en los tejidos de la planta de banano desde antes de propagarse por la lámina de la hoja, puesto que desde que hay contacto de las estructuras de dispersión del patógeno con la superficie de la hoja se observa desorganización de los tejidos (Stover, 1969).

El ciclo de infección se inicia con la germinación de las esporas, las cuales, después de su liberación y dispersión por acción del agua o el viento, se depositan sobre las hojas sanas o ya infectadas. Allí el inóculo germina para producir un tubo germinativo que se alarga y se ramifica rápidamente en busca de estomas, para luego penetrar en un tiempo que va de dos a seis horas. Para que este proceso ocurra es necesario la presencia de agua libre sobre las hojas (Merchán, 2000).

Según Marín y Romero (1992), la propagación de la enfermedad se produce por medio de esporas, las conidias para la forma asexual y las ascosporas para la forma sexual, que requieren de una alta humedad relativa para germinar. Las conidias son liberadas con ayuda del salpique de la lluvia y el deslizamiento del agua por lo que son transportadas a

las hojas de la misma planta y a plantas cercanas. Por otro lado, las ascosporas se dispersan a larga distancia con la ayuda del viento y son las responsables de la introducción paulatina de la enfermedad en nuevas áreas. Seguidamente empieza la fase de incubación donde se visualizan los síntomas.

Las toxinas producidas por *M. fijiensis* afectan la fisiología de las células del mesófilo y éstas entran en un proceso de muerte celular, por lo cual se caracteriza a éste patógeno como un hongo hemibiótrofo. La duración del ciclo de desarrollo en las condiciones óptimas varía de 18 a 20 días pero está sujeta a las condiciones climáticas (Stover, 1976).

Uno de los primeros síntomas de la Sigatoka negra es la aparición de pequeñas manchas cloróticas en la superficie inferior de la tercera o cuarta hoja abierta de, color blanco o amarillo y son visibles únicamente en el envés de la hoja, las cuales van creciendo convirtiéndose en rayas de color marrón oscuro. Luego las manchas se extienden tornándose más largas y anchas y se obscurecen aún más formando las rayas negras de las hojas propias de la enfermedad con el color característico de necrosis. También afecta el tejido adyacente dándole un aspecto de mojado en especial cuando el clima es húmedo. Finalmente la mancha crece (Figura 2), en forma elíptica de color negro redondeada por un anillo amarillo y el centro empieza a deprimirse por consecuencia toma una coloración blanco-gris (Fouré, 1985).

El método tradicional para el control de la Sigatoka negra, conocido como prácticas culturales, está enfocado en reducir la fuente de inóculo del patógeno y forma parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad. Un buen sistema de drenaje, la remoción de las hojas viejas en el suelo junto con la poda sanitaria, y un adecuado programa de fertilización son algunas de las técnicas que se han utilizado durante años como estrategias

para reducir la densidad del inóculo. Además, los agricultores han propuesto el establecimiento de altas densidades de siembra, con el fin de generar un micro y mesoclima al interior de la plantación, creando condiciones desfavorables para el patógeno (Rosales *et al.*, 2002).

Para combatir esta enfermedad se diseñó una estrategia de control químico, asperjando fungicidas sistémicos en suspensiones oleosas para su control. El método de control químico es el más utilizado, el cual consiste de una amplia gama de fungicidas para el control de esta enfermedad, los cuales se pueden agrupar en tres categorías, con base en su modo de acción: fungicidas de contacto o protectantes, de acción sistémica local y fungicidas sistémicos. En cuanto a los fungicidas protectantes con composición básica de clorotalonil, como es Mazoceb son utilizados de forma alternada con fungicidas sistémicos (benzimidazoles, azoxistrobina), estos últimos, son aplicados con aceites o emulsiones como adherente (Romero, 2006). Sin embargo, a finales de los noventa se reportó la resistencia de *M. fijiensis* al grupo químico benzimidazoles, debido a su uso repetitivo. Actualmente, *M. fijiensis* se ha vuelto más agresivo y el número de aplicaciones de fungicidas aumenta cada año. Éstos son aplicados en intervalos de 7-12 días, generando una aplicación de 35-50 ciclos de fungicidas por año en los países bananeros, causando altos costos de producción en sus cultivos (Chica *et al.*, 2004). Para los agricultores bananeros, los fungicidas que se ofrecen en el mercado tienen un elevado costo y presentan a lo largo de su uso un tipo de ineficiencia contra la enfermedad, debido al fenómeno de resistencia. Sin embargo, cuando no hay un control químico, la enfermedad llega a causar una reducción del 56,8 % en el peso del racimo.

Otra alternativa de control para la Sigatoka negra es el mejoramiento genético mediante el desarrollo de híbridos, los cuales han sido impulsados por el programa de mejoramiento

genético convencional de la Fundación Hondureña de Investigación agrícola (FHIA). Éstos han sido distribuidos en más de 50 países alrededor del mundo y han sido evaluados desde 1991 por el programa internacional de Músaceas. Estos datos evidencian que todos los híbridos liberados hasta la fecha poseen adecuadas características comerciales y sobretodo resistencia o tolerancia a la enfermedad. En los últimos 10 años, se iniciaron otros programas internacionales de mejoramiento genético convencional en Brasil, Camerún y Guadalupe, orientados hacia el desarrollo de variedades resistentes a la Sigatoka negra (Rosales y Pocasangre, 2002).

Por otro lado, los consumidores de banano prefieren una fruta libre de plaguicidas, y por lo tanto se presenta la opción de una agricultura orgánica mediante la implementación de algún tipo de control biológico. Este tipo de control se basa en la utilización de microorganismos antagónicos benéficos o que presenten competencia contra el patógeno. Estos microorganismos pueden ser levaduras, hongos, o bacterias con funciones especializadas que ataquen y controlen a los patógenos en las plantas. El objetivo de este manejo es reducir o reemplazar la utilización de los químicos sintéticos que se utilizan sin control en la mayoría de plantaciones (Narayanasamy, 2013).

Adicionalmente, la biotecnología propone la aplicación de bio-pesticidas. Su principio activo está constituido por derivados de plantas, animales o microorganismos (principalmente bacterias y hongos). A diferencia de los pesticidas químicos, su acción es específica contra las plagas que atacan, y se descomponen rápidamente sin que permanezcan residuos dañinos en las plantas.

A pesar de los avances, el empleo de estos microorganismos y el cómo hacerlos eficientes para uso masivo, está aún poco desarrollado. Una de las limitantes en su aplicación es la efectividad disminuida causada por el efecto negativo de factores ambientales, los cuales pueden alterar la supervivencia, actividad y vida útil de estos en la superficie de la hoja. Se ha propuesto el uso de hongos endofíticos, epífitos, micorrizicos, o rizobacterias con gran capacidad para la producción de sustancias que promueven el crecimiento de las plantas, como las auxinas y citoquininas, entre otras (Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006).

En investigaciones anteriores con extractos de plantas, se ha evidenciado la importancia de los metabolitos secundarios como importantes productos antifúngicos, antibacterianos estimuladores del desarrollo fisiológico de la planta o activando los mecanismos de defensa contra plagas y enfermedades (Kagale *et al.*, 2004; Polanco, 2004).

En varios estudios se ha demostrado que los agentes biocontroladores presentan la capacidad de reducir tanto la incidencia como la intensidad de las enfermedades causadas por los patógenos de plantas. Los agentes biocontroladores se los puede dividir en dos grupos según su eficacia frente a las enfermedades causadas por patógenos:

- Agentes bióticos: organismos vivos no patogénicos que exhiben potencial antagónico frente a patógenos microbianos (oomicetes, hongos, bacteria, fitoplasmas, virus y viroides) que son los principales causantes de numerosas enfermedades económicamente importantes en varios agroecosistemas.
- Agentes abióticos: estos agentes pueden actuar directamente inhibiendo el crecimiento y reproducción de los patógenos microbianos o actuar indirectamente sobre las plantas hospederas activando sus sistemas de defensa. Se pueden clasificar basándose en su

constitución química o en el modo de acción en los microorganismos de prueba. Algunos de estos agentes abióticos pueden exhibir mecanismos de acción tanto directos como indirectos sobre sus patógenos microbianos. Pocos de estos agentes abióticos han sido sintetizados con el fin de tener una aplicación contra patógenos y están disponibles como productos comerciales (Narayanasamy, 2013).

3.4 ORGANISMOS ENDÓFITOS

El término endófito fue por primera vez utilizado por De Bary (1866). Según Stone y colaboradores (2000), los organismos endófitos son aquellos microorganismos que colonizan los tejidos vivos internos de las plantas y permanecen en un estado de simbiosis y equilibrio balanceado.

Los endófitos más representativos están dentro del reino Fungi. (Staniek *et al.*, 2008). Éstos microorganismos se pueden encontrar en los siguientes phyla: *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Zygomycota* (Rosa *et al.*, 2012) los cuales han sido encontrados en la mayoría de familias de plantas estudiadas hasta la fecha

Wang y Dai (2011), exponen que los endófitos co-existen con sus hospederos sintetizando a la par sustancias activas biológicas que son similares a los metabolitos secundarios producidos por su hospedero. Existe un gran interés en la biotecnología respecto a los hongos endófitos, ya que son capaces de producir compuestos antibacteriales, antivirales, anticancerígenos, antioxidantes, antidiabéticos, e inmunosupresivos (Strobel y Daisy, 2003; Powthong *et al.*, 2012). Por otro lado, actúan como agentes de control biológico contra la mayoría de enfermedades que causan agentes fitopatógenos en distintos cultivos

ya que se caracterizan por aplicar varias técnicas frente a patógenos clave y su potencial biocontrolador se aplica simultáneamente (Clay, 1989; Schardl *et al.*, 1991; Powthong *et al.*, 2012).

Epicoccum nigrum Link es una especie de hongo endófito, perteneciente a la familia Pleosporaceae, que produce pigmentos de color que se pueden utilizar como agentes antifúngicos contra otros hongos patógenos que atacan a distintos cultivos. Sus colonias son de crecimiento rápido (Wharton y Schilder, 2003).

Es un hongo mitospórico, el que está distribuido extensamente y es aislado comúnmente del aire, suelo y de una gran variedad de plantas e insectos, entre otros. En algunos casos se presenta como oportunista llegando a ser un invasor de tipo secundario en las plantas (Burge *et al.*, 1976). A nivel de laboratorio una de sus atribuciones positivas es que se cultiva fácilmente y crece tanto en el medio líquido como en el semisólido. (Tuttobello *et al.*, 1969). *E. nigrum*, ha mostrado la capacidad de ser un agente biocontrolador de algunas especies como: *Monilinia spp.* en melocotones y nectarinas, *Sclerotinia sclerotiorum* en girasoles, *Pythium* en algodón (Del Cal *et al.*, 2009; Larena *et al.*, 2004; Mari *et al.*, 2007).

La relación de coexistencia entre endófitos y algunas especies de plantas es muy estrecha, en donde las posibilidades de supervivencia de las especies de plantas terrestres están determinadas por sus capacidades de competición (Bascom-Slack *et al.*, 2012). Uno de los factores que afecta la capacidad competitiva es la comunidad de microorganismos que viven en asociación de las plantas terrestres; estos microorganismos afectan la dominación competitiva entre las plantas a través de sus metabolitos (Bascom-Slack *et al.*, 2012). En estudios que se han enfocado en este aspecto, se ha estudiado la convivencia de múltiples

especies de plantas mediada por la interacción con los endófitos. La dinámica de la población se describe por un modelo de competencia revisado para múltiples especies de plantas, cada una de las cuales se divide en dos clases: las plantas con endófitos (EP) y plantas sin endófitos (NEP). El modelo incluye la transición de las semillas de la EP a la NEP, se muestra que múltiples especies de plantas no pueden coexistir en un estado estacionario si esta transición es independiente de la densidad, pero pueden coexistir en un estado estacionario si esta transición es una función creciente de la densidad de población (Iwata y Takeuchi, 2009).

3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES BIOCONTROLADORES

Entre los mecanismos por medio de los cuales los organismos antagonistas actúan, está el micoparasitismo; en donde el agente biocontrolador es capaz de parasitar al organismo patógeno y obtener nutrientes a costa de éste. Algunos de los parásitos fúngicos pueden funcionar como micoparásitos agresivos, que no solamente parasitan las hifas de las especies fúngicas, sino que pueden penetrar y destruir la pared del patógeno, la cual le ayuda a resistir condiciones adversas (Narayanasamy, 2013).

Muchos de los agentes biocontroladores pueden ser considerados mutualistas facultativos, donde la supervivencia raramente depende de un hospedero específico. Dependiendo de las condiciones ambientales, el grado de supresión de la enfermedad puede ir variando. Distintos agentes biocontroladores exhiben un atributo muy importante que es la competencia para lograr obtener sus nutrientes y el espacio para sobrevivir en su nicho. Este tipo de competencia es otro mecanismo que puede llevar a que exista una baja en el

crecimiento y en la actividad de esporulación del patógeno o competidor (Narayanasamy, 2013).

3.6. JUSTIFICACIÓN

Este estudio tiene como finalidad evaluar el potencial de extractos de hongos endófitos y extractos botánicos para ejercer un control de la Sigatoka negra *in vitro*. El estudio se centra en el uso de varios extractos de hongos endófitos mantenidos en la Colección de Hongos Endófitos Quito Católica (CEQCA) y de extractos botánicos seleccionados para inhibir al hongo causante de la Sigatoka negra—*Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Además se hará un análisis para determinar la diversidad de los microorganismos de la filosfera del banano para aislar al hongo *Epicoccum nigrum* y evaluar su efecto como biocontrolador. Este estudio se justifica en la posibilidad de identificar biomoléculas que podrán utilizarse como herramienta de control dentro de un plan de manejo biológico futuro de la Sigatoka negra en finca.

3.7. OBJETIVOS

3.7.1. OBJETIVO GENERAL

Conocer el potencial de inhibición que tienen tanto los extractos de hongos endófitos como botánicos sobre el hongo patógeno del banano, *Mycosphaerella fijiensis*.

3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar mediante secuenciamiento de la región ITS, los hongos de la filósfera de la variedad del Banano Cavendish del género *Musa spp.*
- Evaluar *in vitro* la capacidad de control de *M. fijiensis* mediante el empleo de extractos orgánicos de hongos endófitos observando su eficacia mediante pruebas inhibitorias.
- Determinar *in vitro* el efecto antifúngico de extractos botánicos mediante pruebas inhibitorias de crecimiento.
- Evaluar el efecto de inhibición sobre el desarrollo del patógeno aplicando pruebas antagónicas entre el endófito *Epicoccum nigrum* y *M. fijiensis*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SITIOS DE COLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD

En el mes agosto de 2013, que corresponde a la época seca de verano en el litoral ecuatoriano se colectaron muestras foliares de la variedad del Banano Cavendish, en dos provincias productoras, Los Ríos y El Oro. En estas provincias hay una alta incidencia de Sigatoka negra. Para la recolección de las muestras se buscaron plantas de banano visiblemente afectadas por síntomas de Sigatoka negra. Las plantaciones de banano muestreadas corresponden a las localidades de Baba en la Provincia de Los Ríos, Pasaje, Pagua, y Santa Rosa en la provincia del El Oro.

En la zona de Baba, provincia de Los Ríos, las muestras se recolectaron de la Hacienda “La Mina” que posee una extensión de 44 hectáreas de banano. En la provincia de El Oro, zona de Pagua, las muestras se recolectaron en la Hacienda Ingeniero Morocho, la extensión bananera es de 40 hectáreas; en Pasaje, las muestras se recogieron en la hacienda “Los Ángeles”, con una extensión de 70 hectáreas, y finalmente en Santa Rosa, en una extensión de 300 hectáreas (Figura 2). Se recolectaron cuatro láminas de hojas aéreas para cada uno de los cinco estadios de la enfermedad, haciendo referencia a la descripción de Fouré (1985).

Con la ayuda del agricultor local, se tomaron muestras foliares aéreas de plantas paridas (Paridas se refiere a las plantas que dejan de producir hojas nuevas y recién sale la bellota del racimo, es decir que tiene de 0 a 10 semanas de producción. El riesgo de infección es

alto) y prontas a parir con signos evidentes de enfermedad, las cuales fueron identificadas y registradas con el código de la zona de acuerdo a su escala.

4.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las 19 muestras con los distintos síntomas fueron colocadas en fundas tipo Ziplock durante 48 horas. Fueron transportadas y mantenidas a la temperatura ambiente de su localidad de origen (27-29°C), con el fin de crear un tipo de cámara húmeda y así permitir el desarrollo de los microorganismos presentes en las muestras.

4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos epífitos de la filosfera de plantas de banano, fueron aislados mediante aislamiento directo de las hojas (Conde-Ferráez *et al.*, 2008), aislamiento de conidios (Gómez *et al.*, 2014), aislamiento según Fullerton y Tracey (1984), y método de aislamiento de endófitos (Bascom-Slack *et al.*, 2012). Estos métodos se los describe en detalle en el Anexo 1. Se utilizaron distintos métodos con el fin de ver cuál de ellos era el mejor para el aislamiento de microorganismos.

4.3.1 CLASIFICACIÓN EN MORFOTIPOS

Los aislados obtenidos fueron subcultivados y mantenidos en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se los clasificó visualmente en distintos morfotipos dependiendo de sus características macroscópicas de crecimiento tomando en cuenta aquellos de

crecimiento rápido y lento, forma y color de colonia. Una vez clasificados se los ingresó en la base de datos CEQCA y se los conservó a una temperatura de -80 °C

4.3.2. EXTRACCIÓN ADN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

El ADN genómico fue extraído a partir del micelio de cultivos de hongos con una edad aproximada de 7 a 11 días, por medio de la técnica de aislamiento directo de colonias (Bascom-Slack *et al.*, 2012).

Con el fin de obtener la taxonomía molecular de los hongos aislados se amplificó, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las Regiones Internas Transcritas (ITS) 1 y 2 del gen 5.8 S ribosomal de los cultivos fúngicos mediante los primers ITS1 e ITS4, las secuencias de los primers están incluidas en el Tabla 2 (Schocha *et al.*, 2012). La (PCR) fue llevada a cabo con el kit GoTaq, Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Se utilizó 1X GreenGoTaqFlexi Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1,5 mM de cada primer forward y reverse ITS1 e ITS4, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega), 5 ul de DNA genómico en un volumen final de 50 µl.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 1 minuto a una temperatura de 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido por una extensión final a 72 °C por 5 minutos y finalmente a 10 °C.

Las colonias en las que se identificaron características de crecimiento adecuadas y una mayor incidencia en los cultivos, fueron seleccionadas para realizar el secuenciamiento de

la región ITS amplificada. Las muestras fueron enviadas para su procesamiento a los laboratorios de Macrogen, Geumchen-gu Seoul, Corea.

Las regiones ITS secuenciadas fueron utilizadas para su identificación en GenBank, mediante la herramienta básica de alineamiento local (BLAST), seguidamente se realizó árboles de filogenia mediante el programa RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood), el cual es un programa para llevar a cabo análisis filogenéticos de máxima verosimilitud que involucra un algoritmo rápido, y está diseñado para el análisis de bases de datos muy grandes (Portero, 2013).

4.4 *Mycosphaerella fijiensis* (MORELET)

Como organismo de estudio se utilizó la cepa de *Mycosphaerella fijiensis* GCB 44 gentilmente donado por la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) para lo cual se suscribió un Acuerdo de Transferencia de Materiales. Esta cepa se sembró en medio de cultivo agar haba, dejándola crecer a una temperatura constante de 27 °C.

A continuación se detalla la preparación del inóculo de *M. fijiensis*, con algunas modificaciones de la metodología propuesta por Sierotzki y colaboradores (2000).

El protocolo se realizó para un tubo de 50 ml, en el cual se utilizó 5 tubos de acuerdo a los siguientes puntos: Se cortó 12 discos de agar (1 cm de diámetro cada uno) en pedazos pequeños y se colocó en un tubo con 40 ml de agua MilliQ autoclavada, se mezcló con vortex por 15 minutos hasta conseguir una consistencia homogénea de la solución, se

filtró la solución de los 5 tubos en un frasco de 250 ml, se colocó 1,5 ml de la solución filtrada en tubos de 1,5 ml. Seguidamente se centrifugó a 7 000 rpm por 2 min, retirando 1 ml del sobrenadante de cada tubo, se pipeteó los 500 ul restantes del sobrenadante con el pellet formado y se transfirió a otro tubo con sobrenadante en las mismas características. A continuación se colocó 1 ml del inóculo en cada placa de agar haba y se esparció cubriendo toda la placa, luego se colocó las placas abiertas junto al mechero para secar el inóculo, esto tardó entre 15 a 20 minutos.

4.5 ENSAYOS CON EXTRACTOS ENDOFÍTICOS Y BOTÁNICOS

Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron con extractos de hongos endófitos, suspendidos todos en metanol, y botánicos, los cuales estaban suspendidos en metanol, diclorometano DCM, y acetona. Se utilizó como base el protocolo establecido por Sierotzki y colaboradores (2000) al cual se le realizaron ligeras modificaciones. (Anexo 3) Para esto se distribuyó 1ml de inóculo micelial de *M. fijiensis* (GCB 44) en placa Petri con medio de cultivo agar haba, a cada placa se la dividió en cuatro cuadrantes. En el centro de cada cuadrante, se colocó un disco de difusión de 6 mm (Millipore). Estos discos fueron previamente inoculados con 12ul de cada extracto. Las placas se incubaron por cuatro días a 27 °C. Posterior a este tiempo, se aplicó otro disco con su respectiva fracción siguiendo los mismos pasos para la preparación de extractos. Una vez que se superpuso los dos discos, se colocó 100 µl de Agua MilliQ autoclavada, para así lograr la difusión del extracto hacia el agar. Finalmente se incubó las placas nuevamente a 27 °C, se fue observando y documentando con fotografías de las placas si existió inhibición de crecimiento de *M. fijiensis*, este proceso se lo hizo a los 7, 14 y 21 días del ensayo.

Se emplearon veinte y ocho fracciones correspondientes a extractos de hongos endófitos y treinta de extractos botánicos, con tres repeticiones para cada una. Así mismo, se incluyeron tres controles dependiendo del solvente en que los extractos estaban suspendidos, la evaluación de las pruebas de inhibición frente a los extractos botánicos como endófitos, se la realizó mediante el área de afectación a los 7,14 y 21 días del ensayo. Las siguientes variables fueron registradas al mismo tiempo de la evaluación durante los 7, 14 y 21 días:

- Área sana: Es el área del cuadrante de inhibición donde no hay crecimiento del patógeno *M. fijiensis*.
- Área afectada: Es el área del cuadrante donde hay crecimiento de *M. fijiensis*.

Mediante la utilización del software ImageJ 1.48V se analizó el área de cada cuadrante, y de igual forma el área afectada. La diferencia entre las dos áreas resulta el área no afectada donde no hay crecimiento de *M. fijiensis*. De la relación entre el área total del cuadrante y el área no afectada se obtiene del porcentaje de inhibición (Rasband, 2014).

Una vez recolectada toda la información de la inhibición de áreas, se realizó el análisis estadístico mediante un análisis de la varianza (ANOVA), para las áreas con los extractos botánicos y fúngicos independientemente (Factor DCA con igual tamaño de muestras). Además, se incluyó el análisis de un ANOVA encajado a tres niveles, conjuntamente con una prueba de Tukey, y la estimación de componentes de varianza para todos los extractos (Sánchez – Otero, 2007).

4.6 ENSAYOS ANTAGONISMO

Las pruebas de antagonismo se las realizó con el hongo antagonista *Epicoccum nigrum*, el cual provino de los hongos previamente aislados de las hojas de banano. Las pruebas duales se desarrollaron en medio agar haba, se utilizó como base el protocolo de Lahlali y Hiljri (2010) y se realizaron ligeras modificaciones. Como se detalla a seguir, se tomó un *plug* de agar de 5mm de diámetro de *E. nigrum*, de 18 días de crecimiento a temperatura ambiente, y se lo colocó en una placa de agar haba que ya contenía un “*plug*” del mismo diámetro del hongo patógeno, *Mycosphaerella fijiensis*, de una edad de siete días. Ambos *plugs* uno frente al otro en cada extremo de la placa. Cada cultivo tuvo cinco repeticiones las cuales fueron llamadas A, B, C, D, y E. Como controles se cultivó al patógeno por separado, con el mismo diámetro de las colonias en repetición, y un *plug* de 5mm de agar agua en el extremo, se realizaron tres controles. La colonia hace referencia al crecimiento del organismo fúngico. A las placas de antagonismo se las dejó a temperatura ambiente. Los resultados se documentaron mediante fotos tomadas cada 7 días hasta los 21 días.

4.6.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTAGONISMO

Para poder evaluar los efectos antagonistas cada 7 días se observó el tipo de crecimiento de ambos hongos midiendo el diámetro de crecimiento de la colonia para *M. fijiensis*, hasta que la placa estuvo cubierta totalmente por el micelio de uno de los dos hongos. Se estimó el porcentaje de inhibición (I) mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$I = (R_c - R_i) / R_c \times 100$$

Donde R_i es el radio de crecimiento micelial de *M. fijiensis* hacia el hongo antagonista y R_c es el radio de crecimiento micelial del control (Lahlali y Hijri, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 SITIOS DE COLECCIÓN

Luego de coleccionar en las cuatro localidades: tres localidades en El Oro y una en los Ríos, se obtuvieron 19 muestras, la descripción de las muestras coleccionadas se encuentra en la Tabla 1.

5.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

A partir de las muestras procesadas, se aisló un total de 24 hongos mediante el método de aislamiento directo de las hojas, 22 fueron aislados por el método de aislamiento de conidios, 26 hongos se obtuvieron por el método de Fullerton y Tracey, y 21 hongos del método de Bascom-Slack *et al.* (2012).

Las Figuras 4 y 5 muestran el porcentaje de hongos aislados por provincia y localidad independientemente de cada método de aislamiento. La provincia de El Oro muestra un 56% de hongos aislados, y Los Ríos un 44%. Con respecto a las localidades, Baba presentó una mayor cantidad de hongos encontrados en las hojas de banano, le sigue Pagua con el 30%, Santa Rosa con el 22% y Pasaje con el 4%.

Todos los microorganismos se aislaron en placas de papa dextrosa agar (PDA).

5.2.1 CLASIFICACIÓN EN MORFOTIPOS

El número total de morfotipos aislados de la filosfera del banano, independientemente del método de aislamiento, fue de 68 morfotipos. Un total de 21 morfotipos aislados de los tres primeros métodos utilizados (1. Aislamiento a partir de hojas infestadas, 2. Aislamiento de conidios y 3. Aislamiento de Fullerton & Tracey) se seleccionaron según su incidencia para enviarlos a secuenciar. Del método de Bascom-Slack, se escogió todos los morfotipos aislados, que fueron 21. En la Tabla 2 se muestra la lista de los morfotipos con mayor incidencia, y la localidad de la cual provienen. En la figura 6 se ve el tipo de agrupación que se dio para los morfotipos encontrados, según la observación directa de sus características macroscópicas de crecimiento. La figura 7, incluye al representante de algunos de los morfotipos ya clasificados, los cuales fueron escogidos para la extracción de ADN.

5.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Un representante de cada morfotipo, en total 42, se secuenciaron para la región ITS. El primer análisis fue de secuencia por homología directa, en donde se comparó las secuencias obtenidas con las secuencias depositadas en el GenBank del NCBI, por medio de la herramienta BLAST. Con los resultados obtenidos del análisis molecular de secuencias, como se puede ver en la Tabla 3, todos los morfotipos presentaron secuencias con 100% de similaridad, a excepción del morfotipo M29, que fue eliminado debido a que las características de crecimiento en colonia, no coincidían con las descritas en la literatura.

No todos los morfotipos fueron diferentes entre sí, de los primeros aislados se encontraron 15 especies diferentes las cuales se resumen en la Tabla 4A, mientras que del segundo protocolo se encontraron cinco de veinte y uno especies (Tabla 4B).

Se identificaron un total de 18 organismos patógenos con los cuatro métodos de aislamiento, cinco del género *Fusarium*, todos con características patógenas para distintas variedades de cultivo, entre ellas el banano. El género *Giberella* se presentó en dos morfotipos, patógenos del arroz, maíz, y trigo, entre otros géneros y especies los cuales están resumidos en la Tabla 5.

Adicionalmente, se encontró a una especie de *Xylaria* y el organismo *Epicoccum nigrum* el cual fue utilizado en las pruebas de antagonismo, ambos se caracterizan por ser endófitos.

Xylaria sp. y *Epicoccum nigrum*, fueron los dos únicos organismos endófitos aislados, el patrón de distribución de estos endófitos fue similar en las cuatro localidades en estudio.

5.3. ENSAYOS CON EXTRACTOS ENDÓFITICOS Y BOTÁNICOS

Treinta extractos botánicos, de 10 especies de plantas, y 28 extractos fúngicos de 14 hongos endófitos distintos se emplearon para las pruebas de inhibición de crecimiento (Tablas 6 y 7) de *M. fijiensis*, mostrando una variada actividad antifúngica. Entre estos extractos, disueltos en metanol, acetona, y DCM las que presentaron actividad inhibitoria de crecimiento contra *M. fijiensis*, fueron 14 para las fracciones fúngicas, y 11 para las botánicas.

En la Tabla 6 se encuentra la identificación con género y especie de cada uno de los extractos botánicos utilizados, la Tabla 7 corresponde a la identificación de ciertos extractos fúngicos previamente determinados. Los extractos de hongos endófitos pertenecen al siguiente orden: Xylariales, Pleosporales, Helotiales y aquellos que sólo se ha logrado identificar hasta su clase, pertenecen a la clase: Dothideomycetes y Agaricomycetes. Por otro lado, los extractos botánicos pertenecen a las siguientes familias: Zingiberaceae, Fabaceae, Dilleniaceae, Myristicaceae, Bixaceae, Rubiaceae, Melastomataceae, Lecythidaceae y Urticaceae.

La Figura 8, muestra la prueba de inhibición por parte del extracto bótánico BV402.1D (discos color amarillo) en los dos primeros cuadrantes de la placa, a los 7, 14, y 21 días. En los dos cuadrantes restantes, se ve la inhibición por parte de los extractos fúngico O 1047.2E (discos blancos) en los mismos días de ensayo. Cada fracción de extracto presentó distintos halos inhibitorios de crecimiento.

Al realizar la estimación de los componentes de varianza, con respecto a los extractos botánicos a los siete días las varianzas fueron homogéneas, y a los 14 días y 21 días dejaron de serlo (Anexos 4, 6, y 8). Con relación a los extractos fúngicos, las varianzas presentaron el mismo patrón de homogeneidad en los mismos días del ensayo (Anexos 10, 12, y 14). Lo que implica que cada extracto presenta distintas cualidades antigúngicas contra *M. fijiensis*.

5.3.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

Los siguientes extractos fúngicos correspondientes a ocho distintos endófitos tuvieron un valor mayor o igual al 70% de área de inhibición o área sana: A1576.1D, A1576.1E, A1594.1D, A1594.1E, M1193.1D, M1193.1E, M1242.1D, M1242.1E, M1264.1D, M1264.1E, M1284.1D, O1057.1E, y O1096.1D.

Once extractos botánicos, correspondientes a siete distintas plantas, mostraron valores de área de inhibición mayor o igual al 70% , estos son: 406M, 408D, 408A, 408M, 412D, 424D, 424A, 424M, 431A, 439A, 439D.

Las áreas de las zonas de inhibición obtenidas con los distintos extractos se presentan en la Tabla 8. Estos valores presentan un rango desde 0%, donde el *M. fijiensis* no presenta inhibición, hasta 99,83% donde la inhibición es mayor.

En cuanto a los análisis estadísticos para las variables evaluadas, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a los 14 y 21 días del ensayo, tanto para extractos botánicos y fúngicos (Anexos 4-14).

5.4. ENSAYOS DE ANTAGONISMO

A los siete días del ensayo, las características morfológicas de *M. fijiensis* variaron en las distintas pruebas de antagonismo comparados con el control; presentó las siguientes características macroscópicas para todas las repeticiones (A, B, C, y D): por encima un color más gris que blanco, aplanada no tan elevada, poco algodonosa, micelio aéreo,

aterciopelada, borde ondulado color gris oliva, densidad media, por debajo de la colonia predomina totalmente el color gris oliva oscuro.

Una de las cinco repeticiones de la prueba antagonista presentó contaminación, y fue desechada inmediatamente. En los primeros siete días de observación, el crecimiento del *plug* de *Epicoccum nigrum* fue más rápido que la colonia control, con una diferencia de 0,27 mm en la repetición A, la repetición B no tuvo diferencia, y las repeticiones C y D tuvieron una diferencia en su crecimiento de 0,1 mm con respecto al control. A los catorce días, la repetición A tuvo una diferencia de crecimiento de 0,5 mm, la repetición B creció 0,3 mm, en cuanto a las dos últimas repeticiones, estas tuvieron una diferencia de crecimiento de 0,2 mm.

Se finalizó el ensayo a los 21 días, el micelio de *E. nigrum* cubrió toda la placa, llegando a hacer contacto con la colonia de *M. fijiensis*, las repeticiones A y B mantuvieron su mismo tamaño de colonia, la repetición C aumentó en su tamaño 0,1mm y la repetición D, 0,2 mm, respecto al control (Figura 9).

La morfología de *E. nigrum* durante el ensayo in vitro, tuvo varias características, entre esas presentó la mayor biomasa y crecimiento respecto al patógeno, su crecimiento a pesar de que fue más rápido que la colonia de *M. fijiensis*, fue menos acelerado respecto a cuando éste se encontraba creciendo sólo en medio agar. En los primeros siete días *E. nigrum* creció normalmente, sin alteraciones, su color predominante fue el amarillo mostaza, micelio aéreo, aterciopelado, densidad media. En la Figura 9 se refleja la última fase del ensayo antagonista, que corresponde a los 21 días de incubación.

A los catorce días del ensayo las cuatro colonias de *M. fijiensis* duplicaron su diámetro de crecimiento, dos de estas esporularon. Se evidenció un primer contacto leve de micelio de *E. nigrum* con el borde de las colonias de *M. fijiensis* que esporularon. No se observó ningún tipo de alteración con respecto a su morfología inicial (Tabla 9).

5.4.1. EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTAGONISMO

De la única cepa de *Epicoccum nigrum* probada para su antagonismo hacia el hongo patógeno, no se observó ningún tipo de mecanismo de rechazo hacia la cepa de *M. fijiensis*. El porcentaje de inhibición estuvo por debajo del 4%. Estos resultados están reflejados en la Tabla 10.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se siguieron cuatro métodos de aislamiento de microorganismos propuestos por distintos autores. Los tres primeros métodos enfocados en aislar a *Mycosphaerella fijiensis* u otros organismos patógenos de las plantas. Mientras que el cuarto método de Bascom- Slack, es enfocado en aislar microorganismos endófitos. El patógeno causante de la Sigatoka negra, *M. fijiensis*, no fue aislado en ésta investigación. La cepa donada por el CIBE creció con mucha dificultad en el Laboratorio de Biotecnología de la PUCE debido principalmente a las condiciones de adaptación del patógeno, de igual manera otro factor que es secundario pero que hay que tomar en cuenta, que existió una alta contaminación por parte de esporas de otros hongos. El crecimiento y tamaño óptimo de la colonia fue entre los diez y veinte días.

El mayor número de colonias observadas fue a los tres días después de realizar el inóculo de *M. fijiensis*. Las colonias de *M. fijiensis* se caracterizan por un crecimiento lento hasta los 20 días, con valores de 0,5 a 1,6 cm de diámetro y después permaneció constante. Esto se puede atribuir probablemente a que se agotó la humedad y los nutrientes requeridos para el desarrollo, debido al paso de los días y a que el medio de crecimiento ya no estaba tan joven, tal como lo demostró Stover (1976), quien observó una reactivación del crecimiento del hongo, después de sub cultivarse en un medio fresco.

El género de los microorganismos aislados de la filosfera del banano se determinó mediante el análisis de secuenciación de la cadena de ADN, ubicándolos en los siguientes órdenes: Pleosporales, géneros *Alternaria*, *Cochliobolus*, y *Phoma*. Capnodiales, género *Cladosporium*. Orden Glomerellales, género *Colletotrichum*; orden Incertae sedis, géneros

Epicoccum y *Sarocladium*, orden Hypocreales, géneros *Fusarium* y, *Gibberella*. Orden Trichosphaeriales, género *Nigrospora*; orden Tremellales, género *Trichosporon*, orden Xylariales, género *Xylaria*. Orden Agaricales, género *Coprinellus*. El porcentaje de similitud para las especies identificadas fue del 99 y 100%, determinado mediante la herramienta BLAST.

Dentro de las especies encontradas, se identificó la presencia de *Fusarium oxysporum* asociado al Mal de Panamá en el banano. De igual manera se identificó a *Cochliobolus lunatus* que también es patógeno del banano. Especies del género *Alternaria*, *Nigrospora*, *Giberella*, *Glomerella* y *Fusarium* fueron en su mayoría aisladas del método de Bascom-Slack, 2012, conocidas todas estas por ser patógenos.

La mayoría de patógenos aislados en este estudio ya han sido reportados como patógenos presentes en distintas plantas tropicales (Pereira *et al.*, 1999). El total de hongos aislados e identificados, se los puede manejar dentro de dos categorías para futuros estudios; la primera que contiene a potenciales patógenos de *Musa acuminata*, y la segunda categoría la cual contiene hongos conocidos como patógenos que atacan a distintos cultivos del litoral ecuatoriano.

Según el criterio de Jeger y colaboradores (1995) *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, son severos patógenos en las especies de *Musa*. Asimismo, *Colletotrichum musae* también fue una de las especies aisladas más frecuentes. Ésta no afecta directamente a la planta de banano, pero sí es responsable de la aparición de las manchas negras en la piel de la fruta. Probablemente la presencia de éste hongo en la fruta es una consecuencia de una infección previa de la planta en finca

Con respecto a los hongos endófitos aislados, se conoce que *Xylaria* es un género capaz de utilizar celulosa y lignina, así como también es un fuerte descomponedor de materia orgánica, consiguiendo la muerte de la planta. El rol biológico de la mayoría de especies de *Xylariaceae* es todavía poco conocido, y son consideradas especies saprofíticas (Petrini y Petrini, 1985).

En las cuatro fincas de donde se obtuvieron las muestras foliares se han empleado distintos tipos de fungicidas como tratamiento contra la Sigatoka negra. Riesen y Close (1987) postulan que la eliminación de patógenos asintomáticos latentes en su hospedero, que crecen como posibles endófitos, pueden verse afectados en cultivos sanos que sean tratados con fungicidas. El uso de estos fungicidas afecta a la microfauna natural de la planta reduciendo significativamente las colonias de endófitos. Sorprendentemente sólo dos de las veinte especies identificadas en la filosfera de las hojas de banano fueron especies de endófitos comparado con dieciocho especies de patógenos, sugiriendo que el género *Musa* es un hospedero de una gran cantidad de especies patógenas (Tabla 5).

Las pruebas antagónicas de inhibición son determinadas por la capacidad del organismo endófito de producir metabolitos secundarios que inhiben el desarrollo de una gran variedad de hongos entre ellos los fitopatógenos (Rosa *et al.*, 2012). La ausencia de un halo de inhibición en las pruebas realizadas en medio agar sugiere que este no es un medio que favorezca una interacción antagónica entre *E. nigrum* y *M. fijiensis*. *M. fijiensis* demostró un crecimiento más rápido cuando se encontraba con *E. nigrum*, a comparación del crecimiento presentado cuando se encontraba sólo. Por otro lado, al obtener datos de porcentaje negativos, se podría decir que *E. nigrum* no es eficiente contra *M. fijiensis*, aunque se necesitarían realizar más estudios que no sean *in vitro*, sino *in planta* entre ambos organismos, ya que las condiciones disponibles del medio son distintas a las

condiciones *in vitro*. El medio de cultivo utilizado, agar haba, influyó en la velocidad de crecimiento, ya que se reporta que el tipo de medio de cultivo es un factor clave en el desarrollo del hongo. El color de las colonias de *M. fijiensis* varió de gris oliva – oscuro a pálido y algunas adquirieron un tono blanco- rosado, tal como lo reporta Stover (1976).

Según Cook (2000) la capacidad antagónica de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la forma de la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos. Esta capacidad es el resultado de la agresividad del antagonista y de la susceptibilidad del patógeno (Paul, 1999; Sempere y Santamaría, 2008). El género *Epicoccum* ha sido sugerido por muchos autores como agente de control biológico con propiedad antagonista frente a patógenos que atacan diversas frutas, y además por la activación de múltiples mecanismos de acción, destacándose la capacidad de producir sustancias que promueven el crecimiento e induzcan mecanismos de defensa en las plantas (Larena *et al.*, 2004).

A pesar de esto, los resultados obtenidos durante la evaluación del porcentaje de inhibición, revelan que no hay un valor que supere el 0% de antagonismo frente al patógeno *M. fijiensis*, y no se presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). Es decir que no se presentó un efecto negativo en cuanto al crecimiento de la colonia de *M. fijiensis*.

Asimismo, en las pruebas de inhibición, existió en algunos extractos la ausencia de contacto cerca del disco de difusión, en donde el porcentaje de área sana o área inhibida donde no hay crecimiento de *M. fijiensis* fue igual o menor que el 30%. De este porcentaje hay tres pertenecientes a extractos botánicos y uno perteneciente a extracto fúngicos. La ausencia de crecimiento cerca del disco de difusión puede deberse a la producción de una

gran diversidad de enzimas y compuestos por parte de los extractos, como lacasas, peroxidasas, endoglucanasas, caseinasas, amilasas, exoglucanasas, polifenoles, cumarinas, flavonoides quinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, en su mayoría reportados en la literatura con actividad antifúngica o como inductores de resistencia (Sepúlveda *et al.*, 2003; Kagale *et al.*, 2004); los cuales podrían estar causando que se presente el halo de inhibición. En los últimos cinco años, se han registrado resultados con el uso de extractos botánicos para el control de enfermedades foliares (Sepúlveda *et al.*, 2003; Kagale *et al.*, 2004). En el caso de *M. fijiensis*, es poca la literatura reportada. El presente trabajo es uno de los primeros reportes en Ecuador relacionado con la capacidad de inhibición de extractos endófitos nativos y extractos botánicos nativos.

Respecto a los extractos botánicos, la especie *Lecythidaceae gustavia* correspondiente al código BV432.1A, presentó el menor porcentaje de inhibición a *M. fijiensis*, el valor fue de 10.97 %. Es una especie de árbol propia de los bosques húmedos del Amazonas, sin embargo también puede ser hallada en la cordillera Andina, es usada en construcciones y su savia es utilizada con fines medicinales (Ferrao, 2001). Por el contrario, el extracto BV424.1M presentó el mayor porcentaje de inhibición con un 85,48%. La especie *Mouriri grandiflora* (BV424.1M), perteneciente a la familia Melastomataceae, tiene características que le confieren varios tipos de utilidades, entre esas de tipo medicinal utilizadas por los indios Tikunas en el Ecuador, para la limpieza de los dientes. (Ferrao, 2001). De igual manera ésta familia de plantas se caracteriza por la presencia de alcaloides que generalmente son tóxicos, al ser uno de los grupos más importantes y diversos de metabolitos secundarios encontrados en organismos vivos presentan un alto potencial como agentes biológicamente activos (Coelho-Ferreira, 2007).

En cuanto a los extractos fúngicos, la especie *Entonaema pallida* correspondiente al código M1264.1D tuvo el mayor porcentaje de inhibición con el 91,64%. Es un hongo endófito encontrado a lo largo de la Amazonía y en selvas tropicales con la capacidad de producir metabolitos secundarios es decir una actividad antibacteriana. (De la Torre *et al*, 2008). El extracto fúngico O1074.2E mostró un menor porcentaje de inhibición de un 10,97% solamente, este extracto no ha sido secuenciado.

Durante el ensayo de inhibición, las colonias de *M. fijiensis* crecieron de forma redonda y el micelio aéreo en algunas de color blanco con apariencia algodonosa, de igual manera se presentaron colonias con un micelio aéreo gris - oscuro con apariencia compacta.

El análisis estadístico realizado, nos indica que existen extractos con mayor variabilidad que otros respecto a la capacidad de inhibición de *M. fijiensis*. y que hay claras diferencias entre las distintas especies tanto fúngicas como botánicas, lo que demuestra que ciertos extractos ejercen un mejor control inhibitorio de crecimiento contra el patógeno.

Se conoce que, varios agentes biocontroladores son capaces de disminuir el crecimiento microbial de ciertos patógenos de plantas al no permitir que éstos tengan acceso a los nutrientes o a los tejidos de su hospedero que favorecen a su desarrollo. Muchos de estos agentes biocontroladores pueden ser considerados mutualistas facultativos, en donde la supervivencia raramente depende de un hospedero específico. Dependiendo de las condiciones ambientales, el grado de la supresión de la enfermedad puede ir variando, lo cual es un factor muy importante tener en consideración (Narayanasamy, 2013).

Conociendo el efecto devastador de la Sigatoka negra en el banano, este estudio aunque pudiera parecer muy basal, constituye el punto de partida para nuevas investigaciones en la Colección de Hongos Endófitos Quito Católica (CEQCA); nos da una puerta abierta a que la enfermedad Sigatoka negra pueda ser suprimida mediante la distribución de ciertos extractos fúngicos y botánicos, algunos empleados en este trabajo, que mostraron un alto porcentaje de inhibición hacia *M. fijiensis*. Posteriormente se necesitará conocer más a fondo la estructura genética de los organismos endófitos y botánicos para saber su potencial biocontrolador frente a las distintas micotoxinas producidas por *M. fijiensis* que sigue causando grandes pérdidas en la industria bananera. En un futuro, la combinación de ensayos in vivo e in vitro será muy importante ya que se podrá evaluar en gran variedad al potencial antagónico que poseen algunos de estos extractos en la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*.

7. CONCLUSIONES

Por medio de este estudio se logró identificar la efectividad de inhibición de once de los treinta extractos botánicos y catorce de los veintiocho extractos fúngicos empleados para el control del hongo patógeno del banano *Mycosphaerella fijiensis*.

La mayoría (95%) de organismos aislados de la filosfera del banano fueron identificados como patógenos, mediante el análisis de la región ITS, a excepción de *Epicoccum nigrum*, y *Xylaria* los cuales son catalogados como hongos endófitos.

Se evaluó *in vitro* la vulnerabilidad de *M. fijiensis* frente a extractos orgánicos de hongos endófitos, de los cuales catorce extractos fúngicos presentaron resultados significativos en las pruebas inhibitorias. Los extractos que han sido identificados pertenecen a las siguientes familias: Xylariaceae y Phaeosphaeriaceae.

Se determinó *in vitro* el efecto antifúngico de extractos botánicos mediante pruebas inhibitorias de crecimiento. Los once extractos botánicos que presentaron una inhibición significativa en el crecimiento del hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* pertenecen a las familias siguientes: Fabaceae, Dilleniaceae, Myristicaceae, Melastomataceae y Urticaceae.

En las pruebas antagónicas de inhibición sobre el desarrollo del patógeno el endófito *Epicoccum nigrum* no presentó efecto antagónico sobre *M. fijiensis*.

8. LITERATURA CITADA

Asociación de Exportadores de banano del Ecuador. Estadísticas [en línea].

<<http://www.aebe.com,.ec/desktop.aspx=74>> [consultado: Abril 2014]

Banco Central del Ecuador. 2009 “Estadísticas de comercio Exterior” [en línea].

<<http://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201302.pdf>> [consultado: Marzo 2014]

Barcos, M., Peralta,E., Jiménez, M., Ruiz,O y Gomez P. 2009. Influencia de calcio, cobre y boro en el desarrollo de plantas micropropagadas de banano variedad Williams, e inoculadas con conidias y concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis*. Revista Tecnológica ESPOL 22 (1): 21-28.

Bascom-Slack, C.A., Arnold, A.E. y Strobel, S.A. 2012. Student-directed discovery of the plant microbiome and its products. Science 338 (6106): 485-486.

Bennet, R.S. y Arneson, P.A. 2003. Sigatoka Negra. APSnet feature article [en línea].

<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatokaEspanol.aspx>> [consultado: noviembre 2013]

Burge, W.R., Buckley, L.J., Sullivan, J.D., McGrattan, C.J. e Ikawa, M.1976. Isolation and biological activity of the pigments of the mold *Epicoccum nigrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 24 (3): 555-559.

- Campuzano, A., Cornejo, F., Ruiz, O. y Peralta, E. 2010. Efecto del Tipo de Producción de Banano Cavendish en su comportamiento Poscosecha. Revista Tecnológica ESPOL 23 (2): 41-48.
- Carlton, R.R., Waterman, P.G., Gray, A.I. y Deans, S.G. 1992. The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (*Myrica gale*) (Myricaceae). Chemoecology (3): 55-59.
- Carrillo, L. 2003. Los Hongos de alimentos y forrajes [en línea]. <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/08/htextootros.pdf>> [consultado: Noviembre 2013].
- Cheesman, E. 1947. Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. Kew Bulletin 2(2): 106-117.
- Chica, R., Herrera, M., Jiménez, I., Lizcano, S., Montoya, J.A., Patiño, L.F., Rodríguez, P.A. y Ruíz, L.H. 2004. Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia. p. 53-62.
- Clay, K. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. Mycological Research 92 (1): 1-12.
- Coelho-Ferreira, M. 2007. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). Journal of Ethnopharmacology 126 (1): 159-175.

- Conde-Ferrández, L., Grijalva-Arango, R., Raigoza-Flores, N.E. y James-Kay, A.C. 2008. A simple method to obtain single conidium isolates directly from banana (*Musa* sp.) leaves infected with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Mexicana de Fitopatología* (26): 76-78.
- Cook, R.J. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology* (38): 95–116.
- De Cal, M.A., Larena, I., Liñán, M., Torres, R., Lamarca, N. 2009. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology* 106: 592–605
- .
- De Bary, A. 1866. *Morphologie und Physiologie der pflanzen, flechten und Myxomyceten*, Handbook of Physiological Botany, Vol. 2. Leipzig.
- Espinoza, L., Jiménez, M. y Peralta, E. 2009. Conservación de Agentes Patógenos y Epífitos Presentes en los Cultivos de Tomate, Sandía y Banano y sus Beneficios para la investigación. *Revista Tecnológica ESPOL* 22 (1): 51-56.
- Ferrao, J.E.M. 2001. *Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis*. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical 2: 580l.
- Fouré, F. 1985. Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA. París.

Fullerton, R.A. y Tracey, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the Pacific Islands. Tropical Agriculture (Trinidad) (61):134-136.

Guía Bananera Asociación de Pequeños Productores Bananeros El Guabo [en línea].
<<http://asoguabo.com.ec/espanol/index.htm>> [consultado: Abril 2014].

Gómez, D., Prins, C. y Staver, Ch. 2014. Metodología para la Manipulación y Cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. Manejo integrado de Plagas, hoja técnica [en línea].
<<http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/ht53-a.htm>> [consultado: Septiembre 2013].

Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. In XVII Reunión ACORBAT, Memoria Joinville, Br. (1): 83-91.

Hahner, D., Kirschner, R., Piepenbring, M. y Schöfer, H. 2008. First isolation of the Anamorphic Basidiomycetous Yeast *Trichosporon faecale* in Germany, from the Skin of a Patient with *Tinea pedis*. Mycopathologia 165: 149-153.

Häkkinen, M. 2013. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). Taxon 62(4):809-813.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censo INEC. 2009 “Análisis del sistema Agroalimentario del Banano en el Ecuador”. INEC p.1.

Iwata, S. y Takeuchi, Y. 2009. The relationship between endophyte transition and plant species coexistence. Journal of Biological Dynamics 3 (4): 376-386.

- Jadrane, I., Kornievsky, M., Desjaradin, D.E., He, Z.-H., Cai, L. y Hyde, K. 2012. First Report of Flower Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in White *Phalaenopsis* Orchids in the United States. *Plant Disease* 96 (8): 1227-1227.
- Jeger, M.J., Eden-Green, S., Johanson, A., Waller, J.M. y Brow, A.E. 1995. Banana Diseases. In: *Banana and Plantains* (ed. S. Gowen). Chapman and Hall: London, UK: 317-381.
- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R. y Samiyappan, R. 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and molecular plant pathology* 65 (2): 91-100.
- Lahlali, R. y Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters* 311: 152-159.
- Larena, I., De Cal, A. y Melgarejo, P. 2004. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. *International Journal of Food Microbiology* 94: 161-167.
- Li, C. y Jiang, J.X.. 2013. First Report of Fruit Stem Anthracnose of Kiwifruit Caused by *Glomerella septospora* in China. *Plant Disease* 93 (8): 1115-1115.

- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J.F. 2007. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1271–1277
- Marín, D. y Romero, R. 1992. El combate de la Sigatoka negra. Departamento de Investigaciones, CORBANA. Boletín No. 4: 21
- Marín, D., Romero, R., Guzmán, M. y Sutton, T. 200. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87 (3): 208-222.
- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F. y Osler, R. 2009. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease* 93: 993-998.
- Merchán, V., 2000 , Prevención y manejo de la Sigatoka negra. Boletín Divulgativo. ICA Ed. No 2. Manizales, p. 4-11.
- Ministerio, Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca, 2014. Producción y comercio del banano” Cuarta cumbre mundial del Banano 2013” [en línea]. <[http://www.agricultura.gob.ec/en.guayaquil se inaguro la guin cuarta:cumbre mundial del banano/](http://www.agricultura.gob.ec/en.guayaquil%20se%20inaguro%20la%20guin%20cuarta:cumbre%20mundial%20del%20banano/)> [consultado: Abril 2014].
- Mycobank, International Mycological Association [en línea]. < <http://es.mycobank.org/>> [consultado: Abril 2014].

- Narayanasamy, P. 2013. Biological Management of Diseases of Crops. Characteristics of Biological Control Agents. Springer, Hokkanen Editor, Estados Unidos 1: 9-110.
- Nuangmek, W., McKenzie, E.H.C. y Lumyong, S. 2008. Endophytic Fungi from Wild Banana (*Musa acuminata* Colla) Works Against Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum musae*. Research Journal of Microbiology 3: 368-374.
- Oliveira, R.R., Aguiar, R.L., Tessman, D.J., Nunes, W.M.C., Santos, A.F. y Vida, J.B. 2014. First Report of Leaf Spot Caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil. Plant Disease 98 (2): 280-280.
- Orozco-Santos, M. y Orozco-Romero, J. 2006. Manejo sustentable de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil p110-116.
- Orozco-Santos, M., Manzo-Sánchez, G., Guzmán-González, S., Martínez-Bolaños, L. y Canto-Canché, B. 2011. Management of diseased leaves with black sigatoka to reduce the disease severity in banana Grand Nain. Plant Disease volume poner el número: 101-133.
- Paul, B. 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiosum*. FEMS Microbiology Letters 176: 25-30.

- Pedaue-Flores, R., Vara-Melero, J.M. y Benet-Pallás, V. 1999. Patógenos de Plantas descritas en España. 2da Edición. Sociedad Española de Fitopatología. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino p. 8-25.
- Pereira, J.O., Carneiro-Vieira, M.L. y Azevedo, J.L. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 37-40.
- Petrini, L.E. y Petrini, O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 38: 216-234.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. y Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, in Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1513.
- Plantwise Knowledge Bank. 2014. Plantwise Technical Factsheet [en línea]. <<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=2983>> [consultado: Febrero 2014].
- Polanco, D. 2004. Validación del potencial antifúngico de extractos de plantas sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en el cultivo de banano. Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia p. 138.
- Portero, C.E. 2013. Diversidad de hongos endófitos asociados al género *Polylepis* en el ecosistema del Páramo Andino en los Andes de Norte. Tesis en Magister. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

- Powthong, P., Jantrapanukorn, B., Thongmee, A., y Suntornthiticharsen, P. 2012. Evaluation of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.). International Journal Pharmaceutical and Biomedical Research 3 (2): 132-136.
- Rasband, W. 2014, Image J 1.48 V, Java 1.3.0-20 [en línea]. < <http://imagen.nih.gov/ij>. > [consultado: Abril 2014].
- Riesen, T.K. y Close, R.C. 1987. Endophytic fungi in propiconazole-treated and untreated harley leaves. Mycologia 79: 546-552.
- Rodríguez-Gaviria, P. y Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. Agronomía Colombiana 26 (2): 256-265.
- Romero, R.A. y Guzmán, M. 2006. Efecto de la enfermedad de la Sigatoka negra en la producción y calidad. CORBANA – NIBAP - MUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe. Resúmenes, Congreso Internacional, pp.58.
- Rosa, L.H., Tabanca, n., Tehen, N., Pan, Z., Wedge, D.E. y Morales, R.M. 2012. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smallanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. Microbiology 58: 1202-1211.

- Rosales, F.E., Belalcazar, S. y Riveros, A.S. 2002. Plantain production in Latin America: A new profitable and sustainable technology. In: Global conference on banana and plantain. 28 de septiembre 21 de octubre. Bangalore India p. 37.
- Rosales, F.E. y Pocasangre, L.E. 2002. Mejoramiento convencional de banano y plátano: estrategias y logros. In: Memoria de la XV Reunión internacional ACORBAT. Cartagena, Colombia p.31-43 .
- Sánchez-Otero, J. 2007. Introducción al diseño experimental. J Sanchez Quito Ecuador, p 18-34.
- Schardl, C.L., Liu, J-S., White, J.F., Finkel, R.A., An, Z. y Siegel, M.R. 1991. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Systematics and Evolution*. 178: 27-41.
- Schocha, C.L., Seifertb,K.A., Huhndorfc,S., Robertd,V., Spougea, J.L., Levesqueb, C.A. y Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (16): 6241-6246.
- Schroers, H-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S.C., Kammeyer, P.L., Johnson, S., Sutton, D.A., Rinaldi , M.G., Geiser, D.M. y Summerbell, R.C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101: 44-70.

- Sempere, F. y Santamarina, M.P. 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium* Curv & Thom. International Journal of Food Microbiology 122: 35–43.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 1(21): 355-363.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfield U., Tenzer I., Poirey, S. y Gisi, U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Management Science 56: 833-841.
- Staniek, A., Woerdenbag, H.J. y Kayser, O. 2008. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. Journal of Plant Interactions 3 (2): 75-93.
- Stone, L.K., Bacon, E.W. y White, L.F. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In Microbial endophytes. Edited by W. Bacon and L.F. White. Marcel Dekker Inc., New York, Basel. pp. 3–29.
- Stover, R.H. 1969. The *Mycosphaerella* sp. associated with banana leaf spots. Tropical Agriculture (Trinidad) 46: 325-332.
- Stover, R.H. 1976. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. Tropical Agriculture (Trinidad) 53: 111-114.

- Stover, R. H. 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-756.
- Strobel G. y Daisy B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology* 67: 491-502.
- Tumbaco, J.W. y Jiménez, D.M. 2011. Evaluación del Efecto sobre Sigatoka negra en hojas separadas de banano, Cavendish (variedad Williams), del extracto de *Melaleuca alternifolia* en 3 zonas del Litoral Ecuatoriano. *Revista Tecnológica ESPOL*.
- Tuttobello, L. 1969. Grow and pigmentation of *Epicoccum nigrum* in submerged culture, *Applied Microbiology* 6 17: 847-852.
- Varón de Agudelo, F. y Villa-Sarria, G. 2007. Enfermedades del Maíz y su manejo. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA y de la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, Fenalce.
- Wang, Y. y Dai, C.C. 2011. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology* 61 2: 207-215.
- Wharton, P. y Schilder A. 2003. Michigan blueberry facts. Blueberry Fruit Rot Identification Guide. Dept. of Plant Pathology, Michigan State University. Michigan State University. Extension BulletinE-2847.

9. FIGURAS

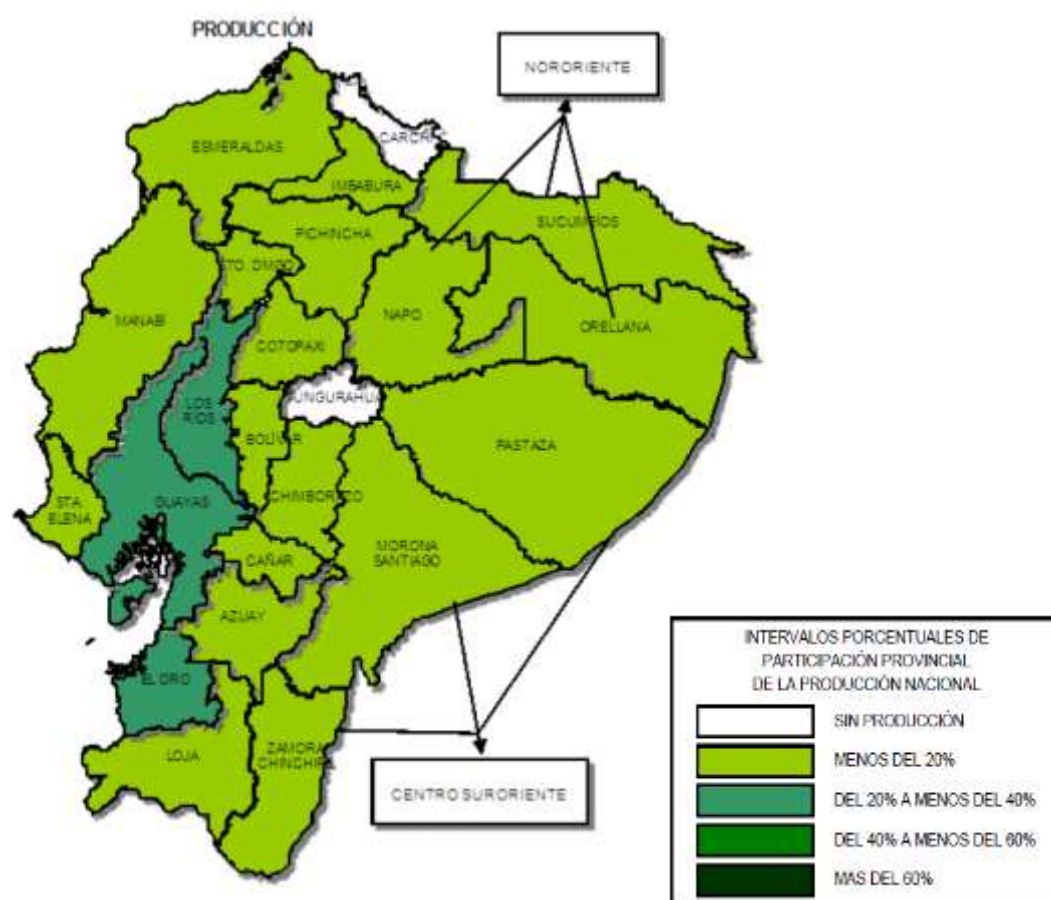


Figura 1 Mapa de participación porcentual de la producción de banano en Ecuador.

Las provincias de Los Ríos, Guayas y El Oro presentan un porcentaje entre el 20% al 40%.

Fuente: MAGAP, 2014.

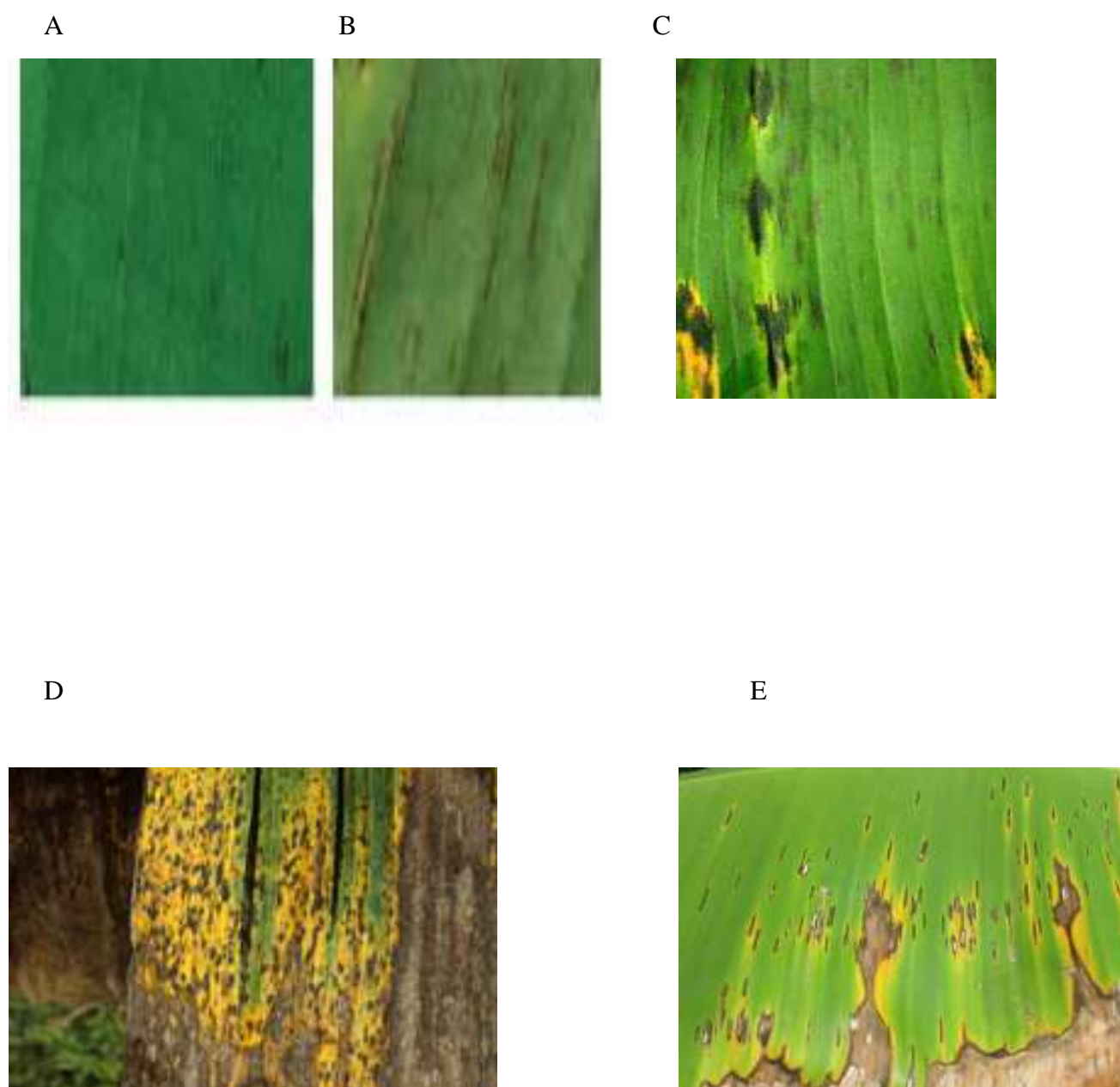


Figura 1. Imágenes de la presencia de la enfermedad Sigatoka Negra sobre una lámina de banano. A) Estadio 1, B) Estadio 2, C) Estadio 3, D) Estadio 4, E) Estadio 5.
Fuente: APSnet 2013.

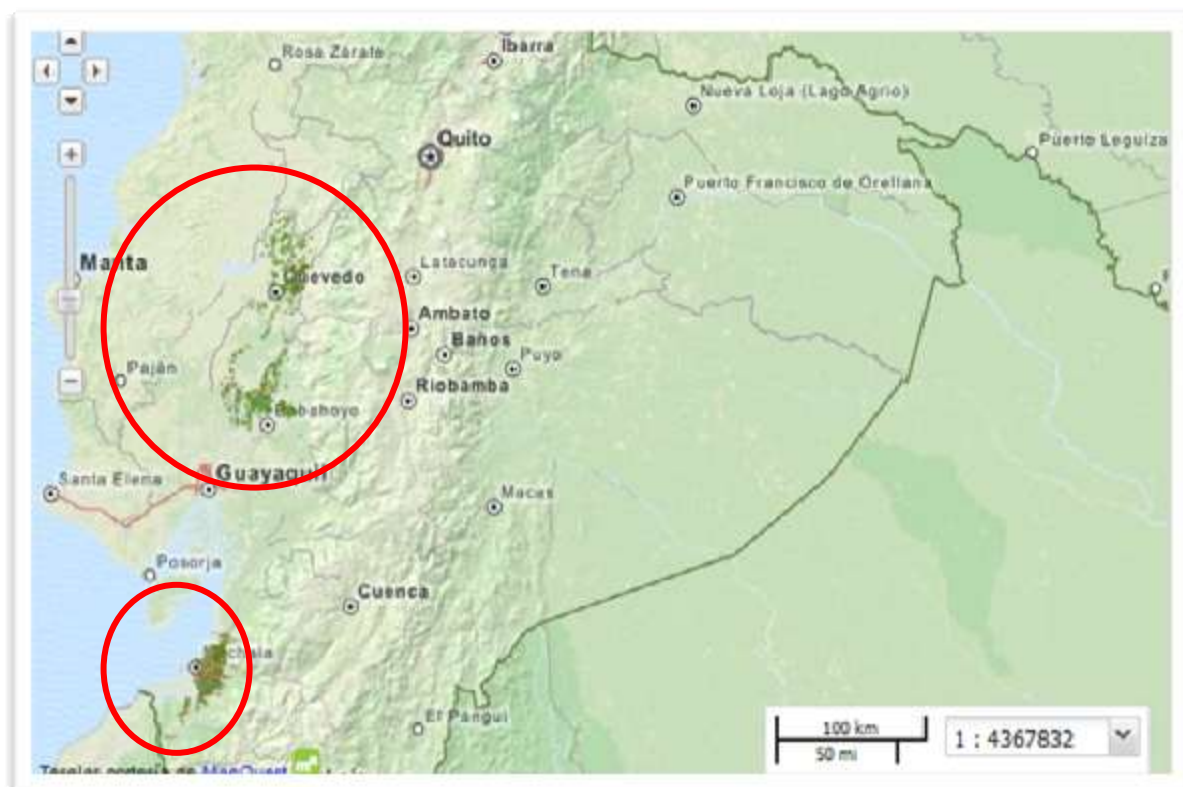


Figura 2 Sitios de colección, áreas en hectáreas de las provincias de Los Ríos y El Oro donde fueron tomadas las muestras. Fuente: MAGAP 2014.

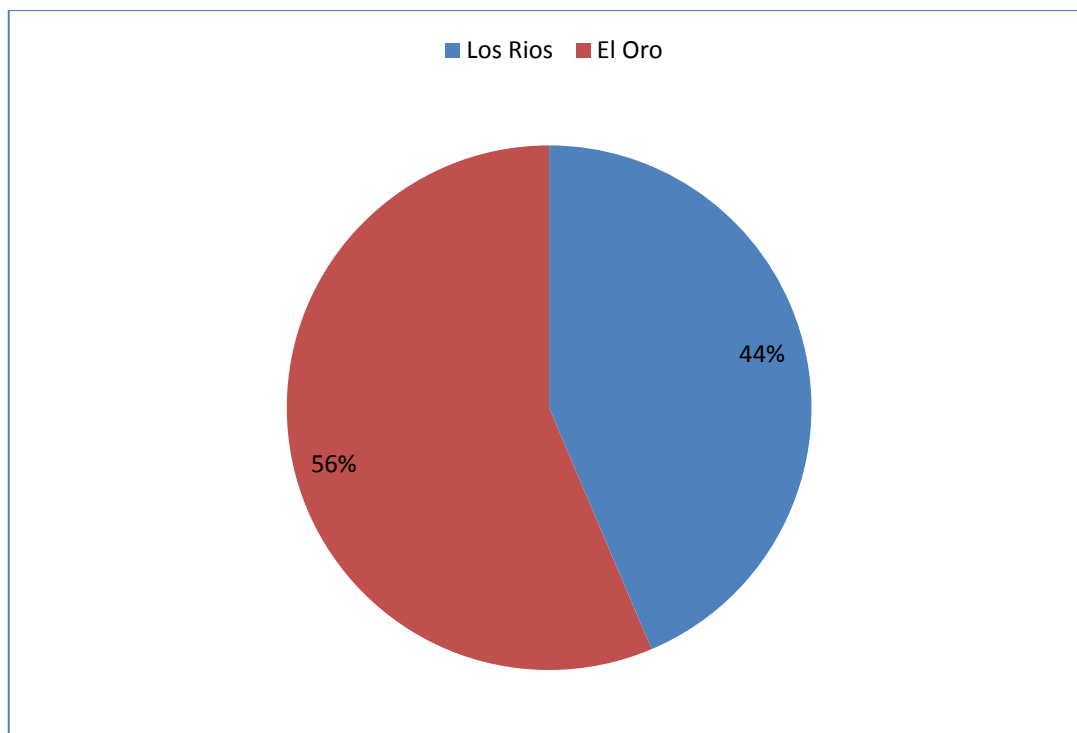


Figura 3 Porcentaje de hongos aislados en Los Ríos y El Oro. Los Ríos representa el 44% de los hongos aislados. La provincia de El Oro, representa el 56% de los hongos aislados.

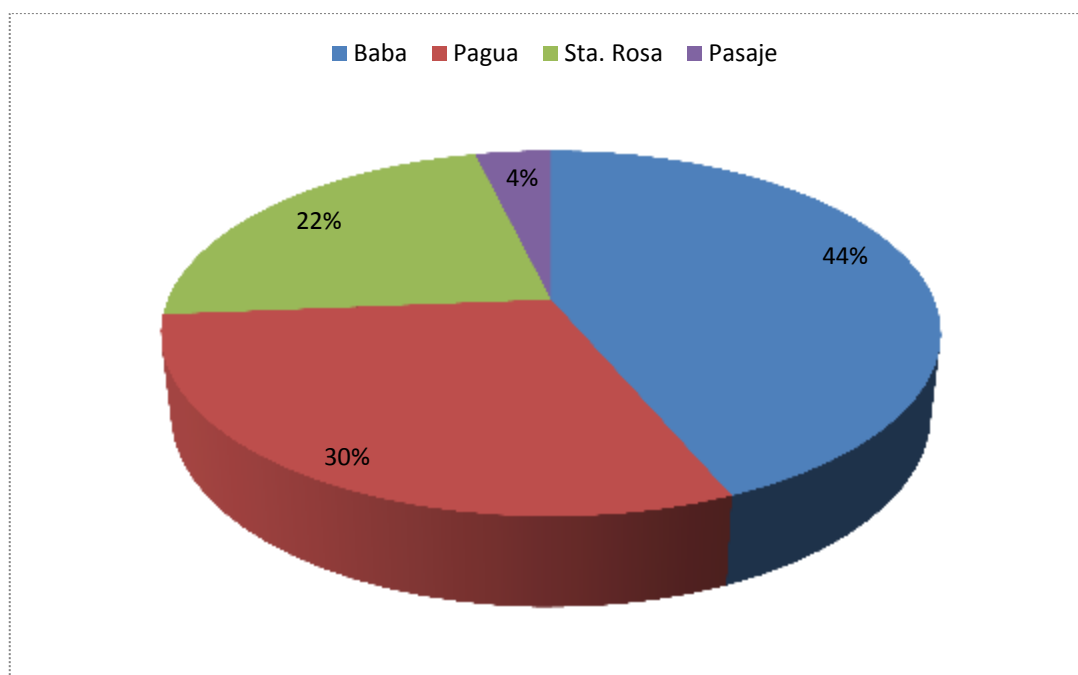
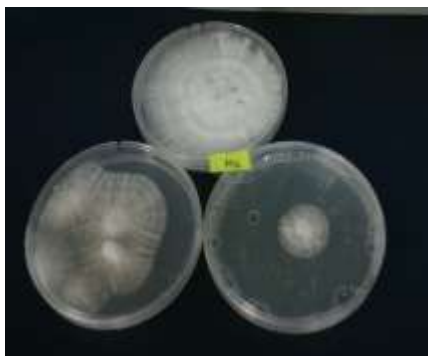


Figura 4. Porcentaje de hongos aislados por localidad. Las localidades Pagua, Santa Rosa y Pasaje en conjunto representan el 56% de los hongos aislados. La localidad de Baba, provincia de Los Ríos, representa el 44% de los hongos aislados.

1A



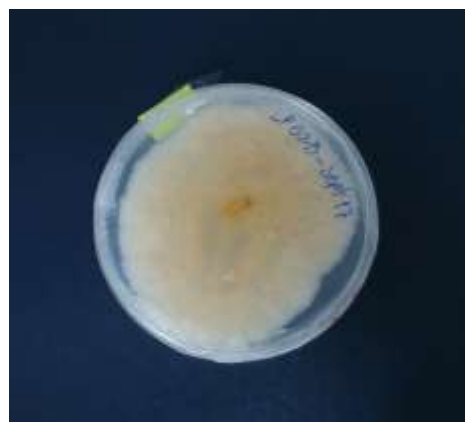
1B



2A



2B



3A



3B



Figura 5. Fotografías de la agrupación de ciertos morfotipos según las características morfológicas presentadas. Crecimiento en Papa Dextrosa Agar PDA. 1 A) Morfotipo 1 (M1)- Vista Superior; 1B Morfotipo 1 (M1)- Vista Inferior; 2 A) Morfotipo 3 (M3)- Vista Superior; 2 B) Morfotipo 3 (M3)- Vista Inferior, 3A) Morfotipo 7 (M7)- Vista Superior; 3B) Morfotipo 7 (M7)- Vista Inferior.

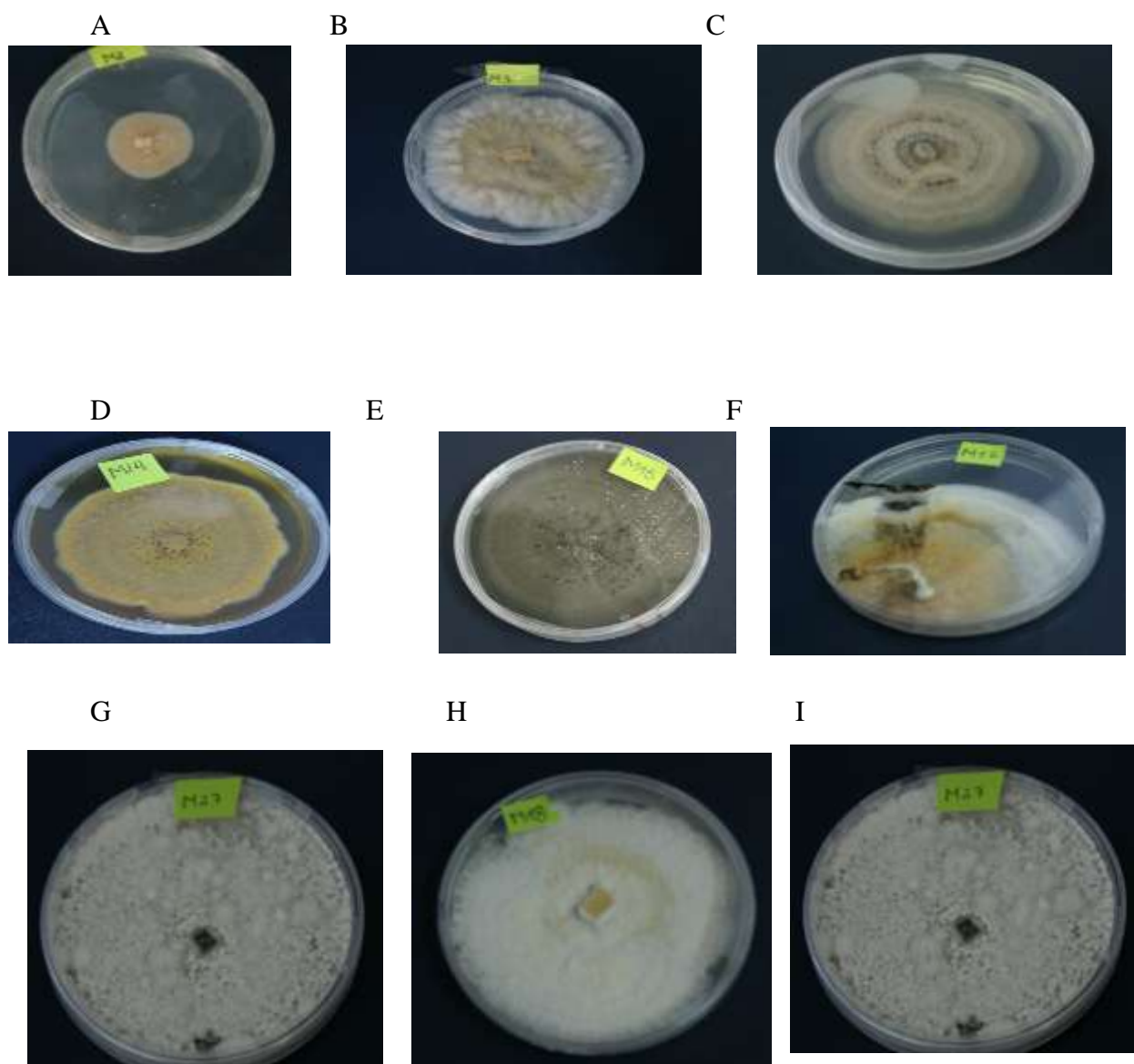


Figura 6. Fotografías de distintos morfotipos obtenidos de la filosfera del banano por medio de los cuatro métodos de aislamiento, crecimiento en Papa Dextrosa Agar. A) Morfotipo 2, M2, B) Morfotipo 3 M3, C) Morfotipo 6 M6, D) Morfotipo 14 M14, E) Morfotipo 15 M15, F) Morfotipo 17 M17, G) Morfotipo 18 M18, H) Morfotipo 27 M27, I) Morfotipo 30 M30.

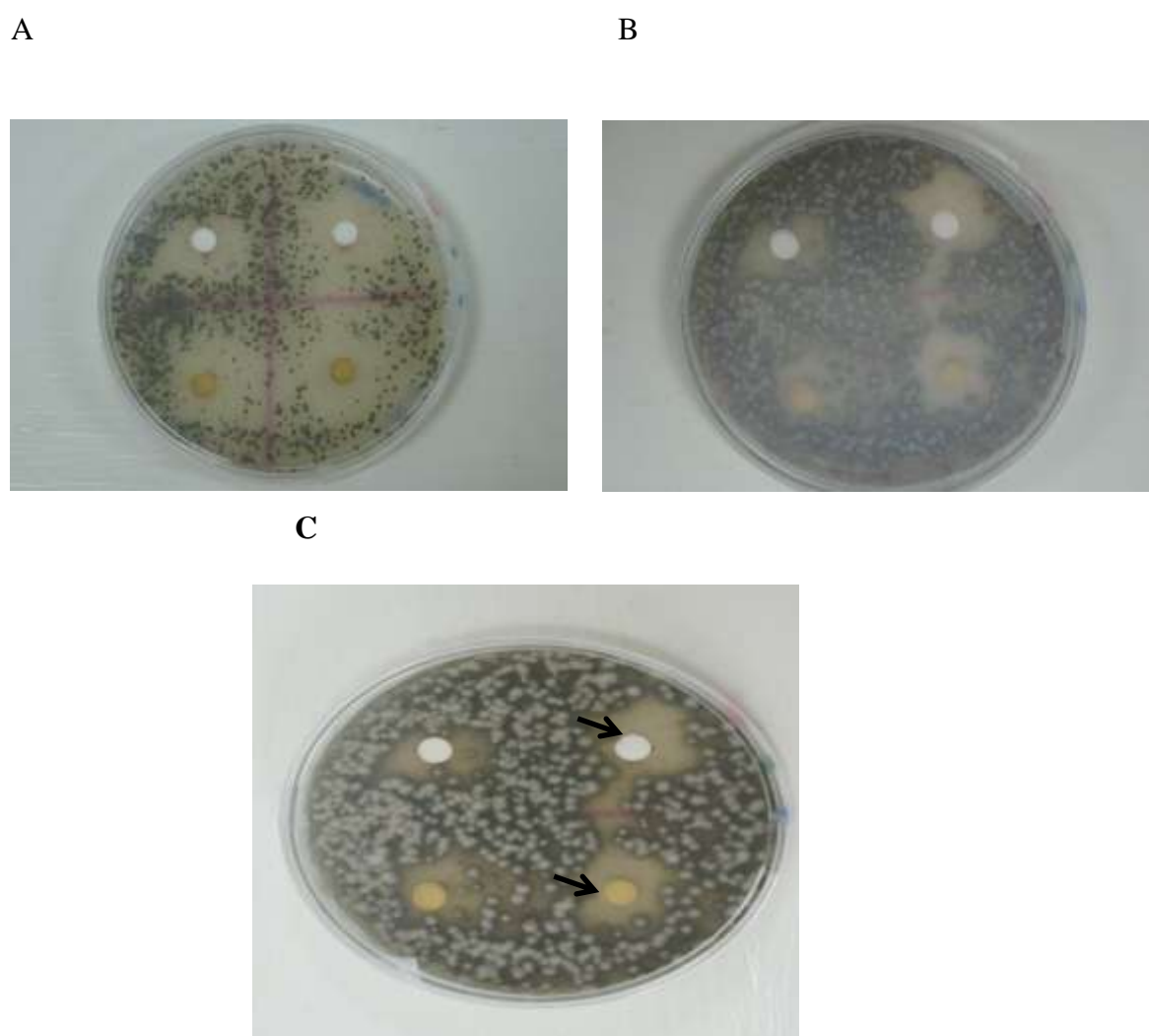


Figura 7. Progreso de crecimiento del inóculo de *Mycosphaerella fijiensis*. En la prueba de inhibición con extractos fúngicos (disco blanco), y botánicos (disco amarillo). A) Siete días después de la colocación de los discos, B) catorce días después, y C) veinte y un días después del ensayo.

A.

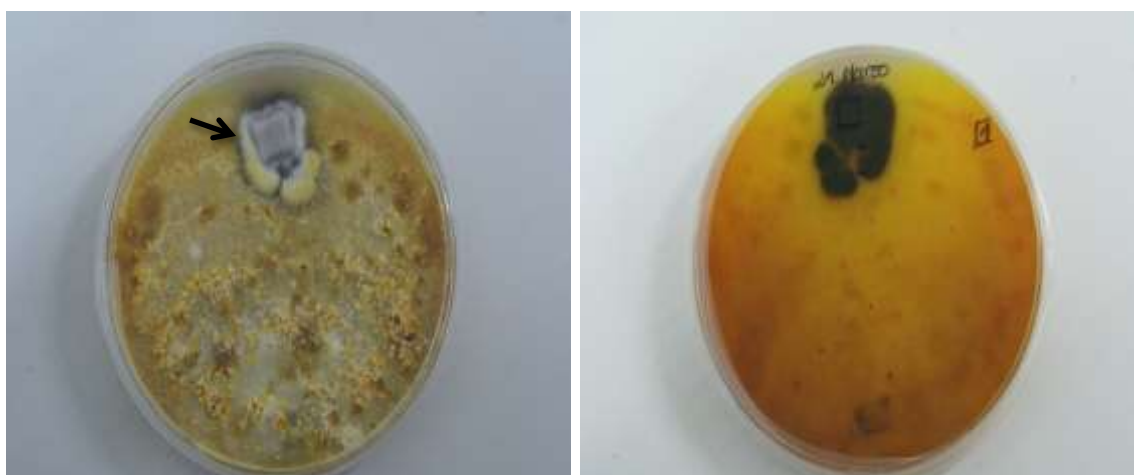


Figura 8. Fotografías de la prueba de antagonismo a los 21 días entre *Mycosphaerella fijiensis* y *Epicoccum nigrum* en medio agar haba. La colonia gris corresponde a *M. fijiensis*; colonia color naranja-mostaza pertenece al hongo antagonista *E. nigrum*. A). 21 días.

10. TABLAS

Tabla 1. Códigos asignados a las tomas de muestras de hojas de banano colectadas en las distintas localidades de las provincias Los Ríos y El Oro

Código	Provincia	Localidad	Parida*	Pronta a Parir**	Estadio	Toma
LP01	Los Ríos	Baba		X	1	Aérea
LP02	Los Ríos	Baba		X	2	Aérea
LP03	Los Ríos	Baba	X		3	Aérea
LP04	Los Ríos	Baba	X		4	Aérea
LP05	Los Ríos	Baba	X		5	Aérea
LP06	El Oro	Pagua		X	1	Aérea
LP07	El Oro	Pagua	X		2	Aérea
LP08	El Oro	Pagua		X	2	Aérea
LP09	El Oro	Pagua	X		3	Aérea
LP10	El Oro	Pagua	X		4	Aérea
LP11	El Oro	Pagua		X	5	Aérea
LP12	El Oro	Santa Rosa	X		1	Aérea
LP13	El Oro	Santa Rosa	X		2	Aérea
LP14	El Oro	Santa Rosa	X		3	Aérea
LP15	El Oro	Santa Rosa	X		4	Aérea
LP16	El Oro	Santa Rosa	X		5	Aérea
LP17	El Oro	Pasaje		X	2	Aérea
LP18	El Oro	Pasaje		X	4	Aérea
LP19	El Oro	Pagua			5	Suelo

***Parida:** plantas que dejan de producir hojas nuevas y recién sale la bellota del racimo

**** Pronta a parir:** plantas que tienen crecimiento de nuevas hojas y no existe producción de bellota

Tabla 2. Lista de los morfotipos con mayor incidencia con su respectiva identificación y localidad proveniente

No	MORFOTIPO	GÉNERO	ESPECIE	LOCALIDAD PROVENIENTE
1	LPM01	<i>Entonaema</i>	<i>pallida</i>	Santa Rosa
2	LPM02	<i>Sarocladium</i>	<i>strictum</i>	Pagua
3	LPM03	<i>Fusarium</i>	<i>equiseti</i>	Pagua
4	LPM04	<i>Curvularia</i>	<i>crepinii</i>	Pagua
5	LPM05	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloesporoides</i>	Santa Rosa
6	LPM06	<i>Fusarium</i>	<i>incarnatum</i>	Santa Rosa
7	LPM07	<i>Fusarium</i>	<i>equiseti</i>	Santa Rosa
8	LPM08	<i>Fusarium</i>	<i>cortaderiae</i>	Pagua
9	LPM09	<i>Fusarium</i>	<i>temperatum</i>	Baba
10	LPM10	<i>Leptosphaeria</i>	<i>sacchari</i>	Baba
11	LPM14	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	Santa Rosa
12	LPM16	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>	Pagua
13	LPM17	<i>Coprinellus</i>	<i>xanthothrix</i>	Baba
14	LPM29	Eliminado		
15	LPM31	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	Baba
16	LPM35	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	Baba
17	LPM37	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	Baba
18	LPM38	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Baba
19	LPM41	<i>Trichosporon</i>	<i>faecale</i>	Pagua
20	LPM46	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	Pagua
21	LPM47	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	Pagua
22	LPM50	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
23	LPM51	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>	Baba
24	LPM52	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
25	LPM53	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
26	LPM54	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Baba
27	LPM55	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Baba
28	LPM57	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Baba
29	LPM58	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Baba
30	LPM59	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Baba
31	LPM60	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	Baba
32	LPM61	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
33	LPM62	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
34	LPM63	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
35	LPM64	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
36	LPM65	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
37	LPM66	<i>Fusarium</i>	<i>dimerum</i>	Pagua
38	LPM67	<i>Glomerella</i>	<i>septospora</i>	Pagua
39	LPM68	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Baba
40	LPM69	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Baba
41	LPM70	<i>Giberella</i>	<i>moniformis</i>	Baba
42	LPM71	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	Baba

Tabla 3. Análisis molecular de secuencias mediante la herramienta BLAST

No	MORFOTIPO	GÉNERO	ESPECIE	VALOR E	COBERTURA	IDENTIDAD
1	LPM01	<i>Entonaema</i>	<i>pallida</i>	0	100%	99%
2	LPM02	<i>Sarocladium</i>	<i>strictum</i>	0	100%	100%
3	LPM03	<i>Fusarium</i>	<i>equiseti</i>	0	100%	100%
4	LPM04	<i>Curvularia</i>	<i>crepinii</i>	0	100%	100%
5	LPM05	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloesporoides</i>	0	100%	99%
6	LPM06	<i>Fusarium</i>	<i>incarnatum</i>	0	100%	100%
7	LPM07	<i>Fusarium</i>	<i>equiseti</i>	0	100%	100%
8	LPM08	<i>Fusarium</i>	<i>cortaderiae</i>	0	100%	100%
9	LPM09	<i>Fusarium</i>	<i>temperatum</i>	0	100%	100%
10	LPM10	<i>Leptosphaeria</i>	<i>sacchari</i>	0	82%	99%
11	LPM14	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	0	100%	100%
12	LPM16	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>	0	100%	99%
13	LPM17	<i>Coprinellus</i>	<i>xanthothrix</i>	0	100%	99%
14	LPM29	<i>Eliminado debido a que fue discordante con la descripción bibliográfica</i>				
15	LPM31	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	0	100%	100%
16	LPM35	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	0	100%	100%
17	LPM37	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	0	100%	100%
18	LPM38	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	0	100%	100%
19	LPM41	<i>Trichosporon</i>	<i>faecale</i>	0	100%	100%
20	LPM46	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	0	100%	100%
21	LPM47	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	0	100%	100%
22	LPM50	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
23	LPM51	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>	0	100%	100%
24	LPM52	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
25	LPM53	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
26	LPM54	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	0	100%	100%
27	LPM55	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	0	100%	100%
28	LPM57	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	0	100%	100%
29	LPM58	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	0	100%	100%
30	LPM59	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	0	100%	100%
31	LPM60	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	0	100%	100%
32	LPM61	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
33	LPM62	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
34	LPM63	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
35	LPM64	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
36	LPM65	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
37	LPM66	<i>Fusarium</i>	<i>dimerum</i>	0	100%	99%
38	LPM67	<i>Glomerella</i>	<i>septospora</i>	0	100%	100%
39	LPM68	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	0	100%	99%
40	LPM69	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0	100%	100%
41	LPM70	<i>Giberella</i>	<i>moniformis</i>	0	100%	100%
42	LPM71	<i>Nigrospora</i>	<i>sp.</i>	0	100%	100%

Resultados del Valor e (E value), Máxima identidad, y Cobertura.

Tabla 4. Identificación molecular de los morfotipos fúngicos utilizando la sub unidad 5.8S rRNA (ITS 2 e ITS4).

A) Morfotipos obtenidos de los tres primeros métodos de aislamiento empleados, B) Morfotipos obtenidos del método de Bascom-Slack *et al.* (2012).

A.

No.	MORFOTIPO	GÉNERO	ESPECIE
4	LPM04	<i>Cochliobolus</i>	<i>lunatus</i>
6	LPM06	<i>Fusarium</i>	<i>lquiseti</i>
7	LPM07		
15	LPM31	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>
17	LPM37		
20	LPM46		
21	LPM47	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>
42	LPM71		

B.

No.	MORFOTIPO	GÉNERO	ESPECIE
22	LPM50		
25	LPM53	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
40	LPM69		
24	LPM52		
26	LPM54		
33	LPM62	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
35	LPM64		
29	LPM58		
34	LPM63		
27	LPM55		
28	LPM57		
30	LPM59	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
32	LPM61		
36	LPM65		

Tabla 5. Descripción de las 20 diferentes especies patógenas aisladas de la filosfera de las hojas de banano, y los cultivos a los que afectan

MORFOTIPO	GÉNERO	ESPECIE	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
LPM69	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Patógeno sobre las variedades de cítricos	Pedaue-Flores <i>et al.</i> , 1999
LPM35	<i>Cladosporium</i>	<i>perangustum</i>	Patógeno del palmito amargo	Oliveira <i>et al.</i> , 2014
LPM04	<i>Cochliobolus</i>	<i>lunatus</i>	Patógeno tomate, sandía y banana	Espinoza <i>et al.</i> , 2009
LPM05	<i>Colletotrichum</i>	<i>karstii</i>	Patógeno de orquídeas	Jadrane <i>et al.</i> , 2012
LPM14	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	controlador biológico	Martini <i>et al.</i> , 2009
LPM66	<i>Fusarium</i>	<i>dimerum</i>	Patógeno del cidro	Schroers <i>et al.</i> , 2009
LPM06	<i>Fusarium</i>	<i>equiseti</i>	Patógeno arroz y maíz, produce la podredumbre de raíz y tallo en los cereales	Pedaue-Flores <i>et al.</i> , 1999
LPM38	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	Patógenotomate, sandía y banana, causante del Mal de Panamá	Espinoza <i>et al.</i> , 2009
LPM70	<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	Patógeno maíz, causa la Pudrición Rosada	Varón de Agudelo, 2007
LPM08	<i>Gibberella</i>	<i>zeae</i>	Patógeno arroz, cebada, maíz y trigo	Pedaue-Flores <i>et al.</i> , 1999
LPM67	<i>Glomerella</i>	<i>septospora</i>	Patógeno kiwi	Li y Giang, 2013
LPM16	<i>Nigrospora</i>	<i>oryzae</i>	Patógeno arroz & trigo	Pedaue-Flores <i>et al.</i> , 1999
LPM10	<i>Phoma</i>	<i>herbarum</i>	Patógeno de la alfalfa y trébol rojo	Carrillo, 2003
LPM02	<i>Sarocladium</i>	<i>strictum</i>	Patógeno soja, avena, maíz, trigo, tomate, esparrago, zanahoria, arveja, habichuela común	Plant Wise, 2013
LPM41	<i>Trichosporon</i>	<i>saecale</i>	Patógeno en cítricos	Hahner <i>et al.</i> , 2008
LPM17	<i>Coprinellus</i>	sp.	Patógeno	
LPM03	<i>Fusarium</i>	sp.	Patógeno	
LPM09	<i>Fusarium</i>	sp.	Patógeno	
LPM68	Nectriaceae		Patógeno	
LPM01	<i>Xylaria</i>	sp.	Endófito	

Tabla 6. Códigos e identificación de los extractos botánicos utilizados.

EXTRACTO	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
BV402.1A	Zingiberaceae	<i>Renealmia</i>	sp.
BV402.1D	Zingiberaceae	<i>Renealmia</i>	sp.
BV402.1M	Zingiberaceae	<i>Renealmia</i>	sp.
BV406.1A	Fabaceae	<i>Browneopsis</i>	<i>ucayalina</i>
BV406.1D	Fabaceae	<i>Browneopsis</i>	<i>ucayalina</i>
BV406.1M	Fabaceae	<i>Browneopsis</i>	<i>ucayalina</i>
BV408.1A	Dilleniaceae	<i>Tetracera</i>	<i>willdenowiana</i>
BV408.1D	Dilleniaceae	<i>Tetracera</i>	<i>willdenowiana</i>
BV408.1M	Dilleniaceae	<i>Tetracera</i>	<i>willdenowiana</i>
BV412.1A	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>paraensis</i>
BV412.1D	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>paraensis</i>
BV412.1M	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>paraensis</i>
BV415.1A	Bixaceae	<i>Bixa</i>	<i>orellana</i>
BV415.1D	Bixaceae	<i>Bixa</i>	<i>orellana</i>
BV415.1M	Bixaceae	<i>Bixa</i>	<i>orellana</i>
BV419.1A	Rubiaceae	<i>Duroia</i>	<i>hirsuta</i>
BV419.1D	Rubiaceae	<i>Duroia</i>	<i>hirsuta</i>
BV419.1M	Rubiaceae	<i>Duroia</i>	<i>hirsuta</i>
BV424.1A	Melastomataceae	<i>Mouriri</i>	<i>grandiflora</i>
BV424.1D	Melastomataceae	<i>Mouriri</i>	<i>grandiflora</i>
BV424.1M	Melastomataceae	<i>Mouriri</i>	<i>grandiflora</i>
BV431.1A	Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>duckei</i>
BV431.1D	Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>duckei</i>
BV431.1M	Myristicaceae	<i>Virola</i>	<i>duckei</i>
BV432.1A	Lecythidaceae	<i>Gustavia</i>	<i>longifolia</i>
BV432.1D	Lecythidaceae	<i>Gustavia</i>	<i>longifolia</i>
BV432.1M	Lecythidaceae	<i>Gustavia</i>	<i>longifolia</i>
BV439.1A	Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>membranacea</i>
BV439.1D	Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>membranacea</i>
BV439.1M	Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>membranacea</i>

Extractos suspendidos en: (A) Acetona, (D) dicloro metano (M) Metanol.

Tabla 7. Códigos e identificación de los extractos fúngicos utilizados, suspendidos en metanol.

EXTRACTO	IDENTIFICACIÓN OBTENIDA
A1488.1D	Agaricomycetes
A1488.1E	Agaricomycetes
A1519.1D	Xylariaceae
A1519.1E	Xylariaceae
A1576.1D	Phaeosphaeria
A1576.1E	Phaeosphaeria
A1594.1D	Xylariaceae
A1594.1E	Xylariaceae
M1193.1D	Xylariales
M1193.1E	Xylariales
M1226.1D	Dothideomycetes
M1226.1E	Dothideomycetes
M1242.1D	<i>Xylaria laevis</i>
M1242.1E	<i>Xylaria laevis</i>
M1264.1D	<i>Entonaema pallida</i>
M1264.1E	<i>Entonaema pallida</i>
M1284.1D	No ha sido secuenciado
M1284.1E	No ha sido secuenciado
O1057.1D	No ha sido secuenciado
O1057.1E	No ha sido secuenciado
O1074.2D	No ha sido secuenciado
O1074.2E	No ha sido secuenciado
O1096.1D	No ha sido secuenciado
O1096.1E	No ha sido secuenciado
O1096.2D	No ha sido secuenciado
O1096.2E	No ha sido secuenciado
O1141.1D	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
O1141.1E	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Tabla 8 Porcentajes de áreas que muestran inhibición de crecimiento de *M. fijiensis*

#	EXTRACTO	7 DÍAS			14 DÍAS			21 DÍAS		
		ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA
		cm ²	%	%	cm ²	%	%	cm ²	%	%
1	A1488.1D	10,01	0,8278	0,1722	9,10	0,5978	0,4022	6,63	0,4355	0,5645
2	A1488.1E	14,06	0,8750	0,1250	11,15	0,7195	0,2805	9,63	0,6215	0,3785
3	A1519.1D	14,03	0,9115	0,0885	12,11	0,7617	0,2383	10,84	0,6820	0,3180
4	A1519.1E	12,73	0,8883	0,1117	11,14	0,7719	0,2281	9,87	0,6838	0,3162
5	A1576.1D	13,12	0,9291	0,0709	10,65	0,7577	0,2423	10,29	0,7320	0,2680
6	A1576.1E	11,51	0,8796	0,1204	10,14	0,8016	0,1984	9,47	0,7485	0,2515
7	A1594.1D	14,09	0,9339	0,0661	12,21	0,8373	0,1627	10,37	0,7112	0,2888
8	A1594.1E	12,86	0,9441	0,0559	11,32	0,8307	0,1693	10,18	0,7470	0,2530
9	M1193.1D	13,65	0,9557	0,0443	12,85	0,8736	0,1264	11,61	0,7892	0,2108
10	M1193.1E	10,76	0,8660	0,1340	9,96	0,8206	0,1794	9,85	0,8111	0,1889
11	M1226.1D	13,44	0,8836	0,1164	11,36	0,7221	0,2779	10,66	0,6775	0,3225
12	M1226.1E	13,18	0,8505	0,1495	10,98	0,7231	0,2769	10,05	0,6619	0,3381
13	M1242.1D	13,00	0,9883	0,0117	12,39	0,8798	0,1202	12,03	0,8544	0,1456
14	M1242.1E	14,65	0,9870	0,0130	12,76	0,9387	0,0613	11,19	0,8234	0,1766

Tabla 8 Porcentajes de áreas que muestran inhibición de crecimiento de *M. fijiensis* (Continuación...)

EXTRACTO	7 DÍAS			14 DÍAS			21 DÍAS			
	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	
	cm²	%	%	cm²	%	%	cm²	%	%	
15	M1264.1D	13,67	0,9925	0,0075	13,20	0,9525	0,0475	12,70	0,9164	0,0836
16	M1264.1E	14,27	0,9343	0,0657	11,79	0,8830	0,1170	11,23	0,8410	0,1590
17	M1284.1D	14,51	0,9962	0,0038	12,19	0,8836	0,1164	11,90	0,8629	0,1371
18	M1284.1E	11,27	0,9066	0,0934	10,72	0,7900	0,2100	8,92	0,6570	0,3430
19	O1057.1D	12,64	0,8972	0,1028	9,80	0,6848	0,3152	6,57	0,4587	0,5413
20	O1057.1E	13,24	0,8723	0,1277	11,67	0,7967	0,2033	10,27	0,7011	0,2989
21	O1074.2D	13,72	0,9273	0,0727	8,27	0,5593	0,4407	7,20	0,4869	0,5131
22	O1074.2E	13,49	0,9180	0,0820	3,94	0,2941	0,7059	3,88	0,2898	0,7102
23	O1096.1D	12,45	0,9484	0,0516	11,78	0,8976	0,1024	5,57	0,4241	0,5759
24	O1096.1E	11,68	0,8703	0,1297	7,98	0,5796	0,4204	6,74	0,4895	0,5105
25	O1096.2D	13,25	0,9133	0,0867	10,69	0,7631	0,2369	9,15	0,6531	0,3469
26	O1096.2E	12,98	0,8633	0,1367	10,44	0,7186	0,2814	8,40	0,5780	0,4220
27	O1141.1D	12,60	0,9191	0,0809	9,30	0,6781	0,3219	6,82	0,4975	0,5025
28	O1141.1E	12,20	0,8708	0,1292	9,13	0,6474	0,3526	4,67	0,3310	0,6690
29	BV402.1A	13,77	0,8958	0,1042	12,56	0,8161	0,1839	10,18	0,6619	0,3381
30	BV402.1D	14,53	0,8901	0,1099	10,21	0,7257	0,2743	6,71	0,4769	0,5231
31	BV402.1M	13,00	0,9397	0,0603	9,33	0,6744	0,3256	6,51	0,4702	0,5298
32	BV406.1A	11,97	0,9389	0,0611	10,68	0,8132	0,1868	9,04	0,6881	0,3119
33	BV406.1D	13,59	0,9306	0,0694	11,46	0,7851	0,2149	9,71	0,6650	0,3350
34	BV406.1M	12,74	0,9047	0,0953	11,33	0,8407	0,1593	9,84	0,7303	0,2697
35	BV408.1A	11,54	0,9049	0,0951	10,91	0,8386	0,1614	9,38	0,7213	0,2787
36	BV408.1D	12,33	0,9350	0,0650	12,06	0,8644	0,1356	11,11	0,7963	0,2037

Tabla 8 Porcentajes de áreas que muestran inhibición de crecimiento de *M. fijiensis* (Continuación)

EXTRACTO	7 DÍAS				14 DÍAS			21 DÍAS		
	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	ÁREA ANALIZADA (ÁREA TOTAL - ÁREA AFECTADA)	ÁREA SANA	ÁREA AFECTADA	
	cm ²	%	%	cm ²	%	%	cm ²	%	%	
37	BV408.1M	13,11	0,9154	0,0846	11,98	0,8050	0,1950	8,76	0,5888	0,4112
38	BV412.1A	12,15	0,9330	0,0670	6,68	0,5130	0,4870	4,83	0,3711	0,6289
39	BV412.1D	13,32	0,9575	0,0425	9,76	0,6621	0,3379	7,61	0,5163	0,4837
40	BV412.1M	12,66	0,9241	0,0759	5,96	0,4862	0,5138	4,49	0,3669	0,6331
41	BV415.1A	12,30	0,9418	0,0582	8,42	0,6449	0,3551	4,44	0,3402	0,6598
42	BV415.1D	13,71	0,9489	0,0511	9,29	0,6157	0,3843	3,70	0,2449	0,7551
43	BV415.1M	12,67	0,9304	0,0696	9,02	0,6621	0,3379	5,16	0,3785	0,6215
44	BV419.1A	11,90	0,8188	0,1812	9,46	0,6510	0,3490	4,85	0,3336	0,6664
45	BV419.1D	13,22	0,9588	0,0412	10,52	0,7634	0,2366	6,98	0,5060	0,4940
46	BV419.1M	12,88	0,9293	0,0707	9,54	0,6733	0,3267	8,81	0,6214	0,3786
47	BV424.1A	13,77	0,9772	0,0228	9,92	0,6845	0,3155	10,60	0,7314	0,2686
48	BV424.1D	14,71	0,9640	0,0360	12,51	0,8314	0,1686	11,35	0,7544	0,2456
49	BV424.1M	13,15	0,9983	0,0017	10,20	0,7551	0,2449	11,55	0,8548	0,1452
50	BV431.1A	12,76	0,9203	0,0797	10,55	0,7221	0,2779	10,43	0,7138	0,2862
51	BV431.1D	12,24	0,9082	0,0918	9,78	0,7323	0,2677	8,01	0,5997	0,4003
52	BV431.1M	14,54	0,9359	0,0641	9,81	0,7190	0,2810	8,21	0,6017	0,3983
53	BV432.1A	13,09	0,9822	0,0178	8,82	0,5912	0,4088	1,64	0,1097	0,8903
54	BV432.1D	11,80	0,8623	0,1377	10,26	0,6950	0,3050	2,81	0,1901	0,8099
55	BV432.1M	14,18	0,9801	0,0199	13,04	0,8463	0,1537	8,65	0,5617	0,4383
56	BV439.1A	13,45	0,9896	0,0104	10,58	0,8077	0,1923	9,81	0,7488	0,2512
57	BV439.1D	13,51	0,9828	0,0172	7,59	0,5263	0,4737	6,53	0,4529	0,5471
58	BV439.1M	11,83	0,8995	0,1005	8,77	0,6163	0,3837	2,86	0,2006	0,7994

Las fracciones en color azul son provenientes de extractos endofíticos, y las de color naranja son extractos

Tabla 9. Crecimiento de la colonia de *M. fijiensis* durante la prueba de antagonismo con *E. nigrum*.

PLACA	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
1	1	1,6	1,6
2	0,7	1,4	1,4
3	0,8	1,3	1,4
4	0,8	1,3	1,5
5	Contaminado	-	-
c1	0,7	1,1	1,4
c2	0,8	1	1,4
c3	0,7	1,2	1,4

c1,c2,c3, “controles respectivos”

Diámetro de colonia medido en cm a los 7,14, y 21 días del ensayo.

Tabla 10. Efecto del organismo endófito, *Epicoccum nigrum*, sobre el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*.

PLACA #	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
1	-37%	-45%	-14%
2	4%	-27%	0%
3	-9%	-18%	0%
4	-9%	-18%	-7%

Porcentaje de inhibición de crecimiento sobre el control.

11. ANEXOS

Anexo 1. Métodos de aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis* a partir de hojas infestadas

1.1 Aislamiento directo de las hojas

- Las hojas más jóvenes de plantas de banano se recolectan con presencia de tejido necrótico, correspondiente a los cinco diferentes estadios.
- Incubar el tejido a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ dentro de fundas de plástico tipo ziplock durante 48 horas. Con el propósito de que funcione como una cámara de humedad.
- Seleccionar una lámina de banano con el estadio deseado, en este caso se selecciona una lámina para cada estadio.
- Cortar tres pedazos de la lámina de un tamaño relativamente pequeño 2x2cm.
- Sumergir los fragmentos en Agua Milli Q autoclavada para limpiar cualquier impureza presente
- Limpiar los fragmentos cortados con un hisopo empapado con etanol 70 %
- Con una pinza estéril colocar cada pedazo con el envez hacia abajo dentro de una caja Petri con medio 1XPDA.
- Observar diariamente la morfología de cada hongo que crece alrededor del pedazo
- Alrededor de los siete días se observa la presencia de los distintos tipos hongos que han crecido.
- EL tejido foliar que no se utiliza se lo almacena a 5°C en bolsas plásticas cerradas hasta por cuatro semanas con poca pérdida de viabilidad

1.2. Aislamiento de Conidios

- Después de las 48 horas de incubación, el tejido foliar se extrae de las bolsas, seleccionando secciones que presenten crecimiento del patógeno.
- Cortar pedazos de 4x4cm de la lámina seleccionada.
- Sumergir el pedazo correspondiente a cada estadio durante 10 minutos en la solución limpiadora Cloro 20% con Tween20 (500µl/L).
- Sacar la lámina con una pinza estéril y secarla ligeramente en papel toalla autoclavado.
- Colocar cada pedazo dentro de cajas Petri, que contiene cada una un disco de papel filtro autoclavado humedecido con 1500µl de Agua MilliQ. El envés hacia arriba con el fin de que haya esporulación.
- Incubar a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 5 días.
- Las placas se observan a los 5 días bajo microscopio para observar si existen conidios.
- El disco de papel filtro es retirado con una pinza estéril y la lámina se traspasa a una caja Petri con Agar Agua 3 %.
- En cada caja Petri con Agar Agua (AA) al 3 %, se localizan las zonas de descarga de ascosporas mediante un microscopio con aumento de 4X ó 10X.
- A las zonas marcadas que presentan descargas de ascosporas en el AA al 3 % se las traspasa a una caja Petri con medio de PDA, Penicilina & Estreptomicina Este procedimiento se realiza en una cámara de flujo laminar

1.3 Aislamiento método de Fullerton & Tracey

1. Después de las 48 horas de incubación, el tejido foliar se extrae de las bolsas, seleccionando secciones que presenten crecimiento del patógeno.
2. Cortar pedazos de las hojas que presenten los distintos estadios de infestación de un tamaño de 4x4cm.
3. Limpiar los pedazos con etanol al 95 %.
4. Colocar los pedazos dentro de una caja Petri con Agar Agua al 3% con el envez hacia el agar.
5. Incubar las cajas por 5 a 6 días a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$.
6. Observar y localizar bajo microscopio las zonas de descarga de esporas.
7. Las zonas marcadas son traspasadas a cajas Petri con medio de PDA, Penicilina & Estreptomicina Este procedimiento se realiza en una cámara de flujo laminar.

1.4 Aislamiento de endófitos

- Lavar todo el tejido vegetal por 30 segundos en agua corriente para remover cualquier tipo de impureza en la superficie.
- Cortar un segmento pequeño de la lámina de la hoja de 2mm de diámetro, utilizando tijeras, o bisturí estéril.
- Colocar los segmentos en una placa Petri pequeña y poner etanol al 95 % dejando que cubra todo el tejido.
- Agitar la placa por 10 segundos, y desechar el etanol, manteniendo el segmento de la hoja.
- Agregar a la misma placa cloro al 10% y agitar por dos minutos.
- Desechar el cloro, y seguidamente llenar la placa con etanol al 70 %, agitando por dos minutos, y desechar el líquido nuevamente.
- Llevar el segmento del tejido en la placa Petri cerrada a una zona estéril de trabajo, dejando la tapa semi-abierta para que el segmento se seque levemente.
- Trabajar con el mechero, y con la utilización de unas pinzas estériles traspasar el segmento a la placa con el medio nutriente que vayamos a utilizar para el crecimiento de los microorganismos.
- Etiquetar a la placa en estudio, y cerrarla con parafilm. Dejarla a temperatura ambiente hasta observar los primeros microorganismos.
- A medida que hay crecimiento de microorganismos, traspasarlos a nuevas placas.

Anexo 2. Secuencias de los primers ITS 1, e ITS 4 Schocha *et al.*, (2012)

Nombre del primer	secuencia (5'->3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Anexo 3. Ensayo con extractos

Preparación de Extractos:

1. Colocar 12 ul de cada fracción en discos de difusión.
2. Dejar secar los extractos por 30 minutos.

Armado del Ensayo:

1. Dividir las placas de agar haba en cuadrantes, y rotular cada cuadrante con la fracción que se va a utilizar en el ensayo.
2. Una vez secas las placas, después de colocado el inóculo, se coloca y presiona ligeramente cada disco en su respectiva fracción.
3. Colocar las placas boca abajo a 27 °C.
4. Después de 4 días, observar inhibición de crecimiento.
5. Aplicar otro disco sobre su respectiva fracción (repetir los pasos para la preparación de extractos).
6. Colocar 100 ul de agua MilliQ autoclavada sobre ambos discos para permitir la difusión del extracto hacia el agar.
7. Incubar las placas a 27 °C boca arriba y observar inhibición de crecimiento.

Anexo 4. Prueba de homogeneidad de varianzas de los valores de las fracciones botánicas sin afectación de crecimiento de *M. fijensis* a los 7 días. Los valores de las áreas se las estimó con el programa ImageJv.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,608	30	62	,058

Anexo 5. ANOVA de los valores de las áreas de cada cuadrante para cada extracto

ANOVA

DATOS

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	80,190	30	2,673	1,128	,337
Dentro de grupos	146,940	62	2,370		
Total	227,129	92			

Anexo 6. Prueba de homogeneidad de varianzas para las fracciones botánicas a los 14 días.

Prueba de homogeneidad de varianzas

DATOS

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,011	30	62	,010

Anexo 7. ANOVA

ANOVA

DATOS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	539,341	30	17,978	4,242	,000
Dentro de grupos	262,766	62	4,238		
Total	802,106	92			

Anexo 8. Pruebas de homogeneidad de varianzas a los 21 días

Prueba de homogeneidad de varianzas

DATOS

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,538	30	62	,001

Anexo 9. ANOVA**ANOVA****DATOS**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1040,385	30	34,679	6,676	,000
Dentro de grupos	322,088	62	5,195		
Total	1362,473	92			

Anexo 10. Pruebas de homogeneidad de varianza para las áreas de las fracciones fúngicas a los 7 días**Prueba de homogeneidad de varianzas****DATOS**

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,088	30	62	,007

Anexo 11. . ANOVA para los datos de las fracciones fúngicas a los 7 días**ANOVA****DATOS**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	124,701	30	4,157	1,258	,220
Dentro de grupos	204,810	62	3,303		
Total	329,512	92			

Anexo 12. Pruebas de homogeneidad de varianzas para las áreas de las fracciones fúngicas a los 14 días

Prueba de homogeneidad de varianzas
DATOS

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,221	30	62	,004

Anexo 13. Anova a los 14 días fracciones fúngicas

ANOVA

DATOS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	201,826	30	6,728	1,878	,018
Dentro de grupos	222,151	62	3,583		
Total	423,976	92			

Anexo 14. Pruebas de homogeneidad de varianzas para las fracciones fúngicas, 21 días del ensayo

Prueba de homogeneidad de varianzas
DATOS

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,225	30	62	,004

Anexo 15. Pruebas fúngicas a los 21 días

ANOVA

DATOS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	374,197	30	12,473	3,056	,000
Dentro de grupos	253,023	62	4,081		
Total	627,220	92			

Anexo 16. Anova encajado a los 21 días para las fracciones botánicas y fúngicas

Medias cuadráticas esperadas^{a,b}

Origen	Componente de varianza			
	Var(PREPARACIONES)	Var(MUESTRAS)	Var(Error)	Término cuadrático
Interceptación	6,000	3,000	1,000	Interceptación,
TRATAMIENTOS	6,000	3,000	1,000	TRATAMIENTOS
PREPARACIONES	6,000	3,000	1,000	
MUESTRAS	,000	3,000	1,000	
Error	,000	,000	1,000	

- a. Para cada origen, la media cuadrática esperada equivale a la suma de coeficientes en las casillas por los componentes de varianza, más un término cuadrático que implica efectos en la casilla de término cuadrático.
- b. Las medias cuadráticas esperadas se basan en la suma de cuadrados del tipo I.

Estimaciones de varianza

Componente	Estimación
Var(PREPARACIONES)	2,354
Var(MUESTRAS)	2,874
Var(Error)	4,763

Variable dependiente: AREA

Método: ANOVA (Tipo I de suma de cuadrados)

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: AREA

Origen		Tipo I de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Interceptación	Hipótesis	14377,435	1	14377,435	522,639	,000
	Error	770,261	28	27,509 ^a		
TRATAMIENTOS	Hipótesis	161,526	1	161,526	5,872	,022
	Error	770,261	28	27,509 ^a		
PREPARACIONES	Hipótesis	770,261	28	27,509	2,055	,028
	Error	401,570	30	13,386 ^b		
MUESTRAS	Hipótesis	401,570	30	13,386	2,810	,000
	Error	571,537	120	4,763 ^c		

a. MS(PREPARACIONES)

b. MS(MUESTRAS)

c. MS(Error)

9. GLOSARIO

Colonia Fúngica: Es el crecimiento del organismo fúngico que presenta características macroscópicas.

Crioconserva: Preparación, mantenimiento y preservación de las características morfológicas, fisiológicas y genéticas de una cepa o material vegetal a largo plazo, en unas condiciones de temperatura ultra bajas

Cultivo: Es el medio orgánico del cual los microorganismos obtienen los nutrientes para su crecimiento en laboratorio.

Estomas: Localizados en el envés de las hojas como pequeños orificios de las plantas donde se produce el intercambio gaseoso con la atmósfera.

Extracto: Sustancia obtenida por extracción de las diferentes partes de una planta, esto incluye las raíces, las hojas, las bayas, la corteza, los tallos y las flores. A veces se utiliza la planta entera y en otros casos puede ser que una parte específica de la planta tenga poderes medicinales y restablecedores. A menudo se usa un solvente como etanol o agua.

Hemibiotrofo: microorganismo que parasita a tejidos vivos por un período de tiempo y continúa su ciclo de vida en tejidos muertos.

Micoparasitismo: Es una forma de parasitismo provocada por hongos que atacan otros organismos, incluso a otros de su misma especie.

Micelio: El micelio es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores (aéreos) o vegetativos. Los micelios reproductores crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los órganos reproductores (endosporios) para la formación de nuevos micelios.

Oomycetes: es un grupo de protistas filamentosos, estructura grande y esférica que contiene los gametos femeninos. Presentan una gran importancia económica puesto que engloban a parásitos de plantas vasculares, muchas de ellas de interés agrícola.

Organismo patógeno: También llamado agente biológico patógeno es todo agente (o cualquier "ente" en otras áreas fuera de la biología) que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal.

Organismo endófito: Microorganismos simbióticos que habitan el interior de las plantas sin causar un daño aparente a sus hospederos.

Organismo biotrofo: Organismos que utilizan células u organismos vivos como recurso.

Plantas paridas: Se refiere a las plantas que dejan de producir hojas nuevas y recién sale la bellota del racimo, es decir que tiene de 0 a 10 semanas de producción. El riesgo de infección es alto.

Plantas prontas a parir: Plantas que tienen crecimiento de nuevas hojas y no existe producción de bellota. El riesgo de infección es bajo.

Plug de agar: taco, tapón, o disco de agar pequeño

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Lorena Pazmiño Horra, C.I. 1715428098 autor del trabajo de graduación intitulado: " Evaluación *in vitro* de la capacidad de extractos orgánicos de biodiversidad ecuatoriana para inhibir al patógeno *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) causante de la Sigatoka Negra en banano.", previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales**:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 15 de Agosto 2014

C.I. 1715428098